

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA NUTRITION DES FLAGELLÉS

I. — *POLYTOMA UVELLA ET POLYTOMA OBTUSUM :*
NÉCESSITÉ DU FER, NUTRITION AZOTÉE

par ANDRÉ LWOFF et HISATAKE DUSI.

(*Service de Physiologie microbienne
de l'Institut Pasteur.*)

Quoique *Polytoma uvella* soit devenue, pour les recherches sur la nutrition des flagellés, un matériel classique, l'accord n'est pas encore réalisé au sujet de certaines modalités de sa nutrition. C'est à E. G. Pringsheim que l'on doit le premier travail sur cet organisme en culture pure et la conclusion que l'acide acétique peut être utilisé comme aliment carboné. Ce travail a servi de point de départ à de nombreux travaux sur la nutrition carbonée des flagellés Leucophytes. A la suite des recherches effectuées à l'Institut Pasteur (A. Lwoff, Lwoff et Dusi, Lwoff et Provasoli, Provasoli), l'accord est aujourd'hui réalisé sur la nutrition carbonée des diverses espèces de *Polytoma*, mais un désaccord fondamental subsiste au sujet du problème suivant : *Polytoma uvella* peut-elle se développer en l'absence de facteurs de croissance ? Oui, affirment A. Lwoff et H. Dusi. Non, maintient E. G. Pringsheim. C'est ce problème qui sera examiné ici.

HISTORIQUE.

En 1921, Pringsheim annonçait avoir cultivé *Polytoma uvella* dans le milieu suivant :

Acétate de sodium	0,2
Glycocolle	0,2
Carbonate de potassium	0,2
Sulfate de magnésium	0,01
Phosphate bipotassique	0,02
Eau distillée	100

Pringsheim réussissait ensuite à remplacer le glycocolle par un sel d'ammonium et obtenait un bon développement dans un milieu ainsi constitué :

Acétate d'ammonium M/30 à M/40.	
Sulfate de magnésium + 7H ₂ O	0,01 p. 100
Phosphate bipotassique	0,02 p. 100

Il conclut donc à la possibilité de l'utilisation des sels d'ammonium comme aliments azotés.

Pour ce qui concerne les nitrates, il est difficile de comprendre exactement la conclusion de Pringsheim. Nous lisons, en effet, p. 102 (1921) : « Nitrate dagegen können nicht gut verarbeitet sein », ce qui peut se traduire : « Les nitrates, par contre, ne peuvent pas être bien assimilés. » Plus loin (p. 103), nous trouvons ceci : « Pepton wird schlecht, Albumin noch schlechter verarbeitet, Nitrate fast gar nicht. » Cela semble vouloir dire, d'une part que les nitrates ne sont « pas bien » assimilés, d'autre part qu'ils ne sont « presque pas du tout » assimilés. On pourrait en conclure que Pringsheim a voulu dire que les nitrates sont légèrement assimilés.

En 1928, 1929 et 1932, A. Lwoff montrait qu'un milieu à l'acétate d'ammonium permet le repiquage en série de cultures de *Polytoma uvella*, mais qu'il est nécessaire d'ajouter du fer aux milieux de culture. Cet auteur observait, d'autre part, que le nitrate n'est pas assimilable du tout et que les peptones, par contre, constituent d'excellents aliments azotés. Ces conclusions étaient par la suite confirmées par Pringsheim en 1937 (voir tableau I).

TABLEAU I. — Nutrition azotée de *Polytoma uvella* et de *Polytoma obtusum*

	PRINGSHEIM 1921	LWOFF 1928-1929-1932	PRINGSHEIM 1937
Nitrates	± (1)	0	0
Sels d'ammonium	++	+++	++
Glycocolle	++	++	++
Cystéine		+++	++
Asparagine		+++	++
Glucosamine		+++	++
Peptones	± (2)	+++	++

(1) « Pas bien assimilés ».

(2) « Mal assimilées ».

En réalité, A. Lwoff avait travaillé sur une forme dont Pascher devait, en 1927, faire un type particulier « qui, plus tard, pourrait être érigé en espèce à la suite de travaux plus précis ». Cette forme était caractérisée par des extrémités plus arrondies que celles de *Polytoma uvella sensu stricto*. L'étude comparative d'une souche de *Polytoma uvella* et de la souche de Lwoff a montré à Lwoff et Provasoli que celle-ci appartenait au type *obtusum*, dont ils ont fait une espèce. Ces flagellés possèdent une papille cytoplasmique et sont dépourvus de stigmate ; le noyau est central. Une bonne étude cytologique en a été faite par Volkonsky (1930). Les caractères morphologiques qui différencient *Polytoma uvella* et *Polytoma obtusum* n'ont trait qu'aux proportions relatives des deux formes. Pour les établir, il faut étudier les individus adultes, bien nourris. En fait, on n'aurait jamais pu séparer avec certitude la souche de Lwoff du type *uvella*, si des différences physiologiques très nettes de la nutrition carbonée de ces deux formes n'avaient pu être mises en évidence. Mais *Polytoma uvella* et *Polytoma obtusum* ont en commun les caractères suivants :

1° Aucune de ces deux espèces n'a besoin de facteurs de croissance ;

2° Les deux espèces peuvent utiliser un sel d'ammonium comme seul aliment azoté et ne peuvent utiliser les nitrates. Tout ce que nous dirons au cours de ce mémoire sera valable

pour les deux espèces, sauf ce qui a trait aux acides aminobutyriques.

En 1937, E. G. Pringsheim étudie la valeur de divers aliments azotés dans le milieu suivant :

Acétate de sodium	0,2
Sulfate de magnésium	0,01
Phosphate bipotassique.	0,01
Chlorure ferrique.	0,00001
Eau distillée	100

Ce milieu est additionné d'un aliment azoté à 0,1 p. 100. Dans ces conditions, d'après Pringsheim, seules les peptones peuvent servir d'aliment azoté. Les acides aminés et les sels d'ammonium ne peuvent être utilisés qu'en présence de « Wuchsstoffe », c'est-à-dire de facteurs de croissance, apportés soit par la décoction de terre (Pringsheim, 1935-1936), soit par le « Glukose-Karamel ». Depuis que Lwoff et Lederer (1935) ont montré que la décoction d'humus peut servir d'aliment azoté à de nombreux flagellés, Pringsheim l'a abandonnée au profit du caramel, dépourvu d'azote.

Dans le milieu ci-dessus, en présence de caramel, Pringsheim trouve que les nitrates sont totalement inutilisables pour *Polytoma uvella*, mais que les sels d'ammonium et divers acides aminés peuvent assurer la nutrition azotée (v. tableau I). « Ces expériences, écrit Pringsheim, furent d'abord conduites sans addition de facteurs de croissance, parce que j'avais confiance dans les conclusions de Lwoff, qui se montrèrent cependant inexactes. » En l'absence de caramel, il n'y avait, aussi bien avec l'asparagine qu'avec la glucosamine, la cystéine et le glycocolle, qu'une seule culture positive avec ensemencement faible. Le second repiquage était négatif. Pringsheim ne donne malheureusement ni la quantité du liquide qu'il a ensemencé, ni le nombre de flagellés ensemencés, ni la densité finale des cultures.

Pringsheim nie donc la possibilité de la culture de *Polytoma uvella* dans des milieux du type décrit par lui en 1921, même si ces milieux sont additionnés de fer, et il est effectivement impossible d'obtenir un développement de *Polytoma uvella* et de *Polytoma obtusum* dans les milieux décrits par Pringsheim en 1921. « Dans mes anciennes expériences — écrit

Pringsheim en 1937 — j'avais utilisé du verre ordinaire de Thuringe ; c'est pourquoi le manque de fer ne pouvait se faire sentir, comme dans les expériences de Lwoff effectuées avec du verre pyrex. » Mais, en réalité, non seulement il n'y avait pas de fer dans le milieu de Pringsheim en 1921, mais il n'y avait pas non plus de caramel, qui maintenant est considéré par Pringsheim comme une source indispensable de facteurs de croissance. Et si Pringsheim a obtenu en 1921 des cultures dans des milieux inadéquats, c'est qu'il n'effectuait pas de repiquages en série et que les résultats pouvaient se trouver faussés par l'apport de substances étrangères au milieu avec les flagellés ensemencés.

L'une de ses conclusions de 1921 reste cependant exacte : un sel d'ammonium peut assurer la nutrition azotée de *Polytoma uvella*, mais nous allons montrer qu'il n'est pas du tout indispensable d'ajouter du caramel au milieu pour obtenir la multiplication des *Polytoma*.

NÉCESSITÉ DU FER POUR *Polytoma uvella*
ET *Polytoma obtusum*.

Il a été noté (Lwoff, 1928-1929) que le développement des *Polytoma* dans un milieu à base de sels d'ammonium ne se produit que si l'on ajoute du fer au milieu. *Polytoma* se comporte comme tous les organismes aérobies. En 1932, Lwoff utilisait le milieu suivant :

Acétate d'ammonium	2
NaCl	0,04
SO ₄ Mg.	0,1
PO ₄ K ₂ H	0,2
CaCl ₂ (ajouté après stérilisation)	0,05
Eau bidistillée.	1.000
Carbonate de potassium, q. s. pour pH 8.	

Le fer était ajouté après stérilisation sous forme de chlorure ferrique, en quantité suffisante pour que la concentration du milieu soit de 0,005 p. 1.000.

Notons tout de suite les différences entre le milieu de Pringsheim 1937 et le milieu de Lwoff 1932. Le milieu de

Pringsheim est dépourvu de calcium ; il est additionné de chlorure ferrique à concentration de 1 p. 10 millions *avant* stérilisation. Le milieu de Lwoff est additionné de chlorure de calcium et de chlorure ferrique à 1 p. 200.000 *après* stérilisation. Dans ce milieu, Lwoff obtenait régulièrement des repiquages en série, à condition toutefois de pratiquer des ensemencements larges. Il est possible que la nécessité d'un ensemencement large soit due à la nécessité d'un développement rapide ; dans les milieux alcalins du type utilisé, une grande partie du fer précipite et les flagellés ne peuvent évidemment se développer que pour autant que cette précipitation n'a pas été complète.

NOUVELLES RECHERCHES.

Au cours de nos recherches sur la pyrimidine et le thiazol considérés comme facteurs de croissance pour divers flagellés, nous avons été amenés à constater que, lorsque les tubes de verre sont bouchés avec du coton cardé, des filaments de coton tombent dans le milieu et lui apportent ainsi de la pyrimidine et du thiazol [Lwoff et Dusi, 1938 (1)]. Ces filaments de coton peuvent apporter, bien entendu, d'autres facteurs de croissance ou des éléments divers. Cette constatation posait à nouveau le problème du besoin de facteurs de croissance pour les *Polytoma*. Il fallait de toute nécessité éliminer le coton cardé. Les tubes ont été tout d'abord préservés des contaminations par un second tube de verre renversé sur le premier. Par la suite, nous avons fait construire des tubes à essai en verre pyrex rodés sur leur partie supérieure externe ; sur ce rodage vient s'emboîter un couvercle rodé intérieurement, prolongé par un tube prenant insertion à sa partie supérieure et recourbé vers le bas à 45° ; ce tube est garni d'un tampon d'amiante préalablement porté au rouge, maintenu entre deux tampons de coton de verre. La stérilité de la culture et son aération sont ainsi assurées en l'absence de coton cardé.

(1) SCHOPFER et RYTZ [Ark. f. Mikrobiol., 8, 1937, p. 244] avaient montré auparavant que la décoction de coton cardé renferme de la pyrimidine et du thiazol.

Constituons alors le milieu suivant :

Acétate d'ammonium	4
Biphosphate de potassium	0,2
Sulfate de magnésium	0,1
Chlorure de potassium	0,1
Eau bidistillée	1.000
Soude, q. s. pour pH 7,5.	

Après stérilisation, on ajoute du chlorure de calcium stérilisé à part, concentration finale 1 p. 100.000, et du citrate ferrique en proportions variables. En présence de citrate ferrique à 1 p. 100.000, *Polytoma uvella* et *Polytoma obtusum* se multiplient parfaitement.

Si l'on ensemence un tube renfermant 4 cent. cubes de milieu avec 1 goutte d'une culture prélevée à la phase logarithmique de croissance et renfermant 300 flagellés par millimètre cube, on obtient, en quarante-huit heures, à 22°C, une culture très abondante, dont la densité varie de 1.000 à 2.000 flagellés par millimètre cube. 35 repiquages en série ont été effectués dans ces conditions.

Une critique peut être faite à ces expériences : le sel de fer est un sel organique : le citrate, présent en assez forte concentration ; ce citrate pourrait apporter des facteurs de croissance. Nous avons pu diminuer jusqu'à 1 p. 10 millions la concentration du milieu en citrate de fer et obtenir ainsi d'excellentes cultures. La présence de facteurs de croissance apportés par le citrate de fer sous forme d'impuretés devient ainsi extrêmement douteuse et l'on peut exclure totalement l'apport de facteurs de croissance en remplaçant le citrate de fer par un sel de fer minéral : le chlorure ferrique. Si l'on ajoute du chlorure ferrique au milieu de culture avant stérilisation, tout le fer est précipité et le milieu se comporte comme un milieu sans fer ; il est impropre au développement des *Polytoma*. Ceci est exact même si l'on ajoute au milieu, avant stérilisation, du fer en quantité suffisante pour obtenir une concentration de 1 p. 100.000, c'est-à-dire cent fois plus que la quantité utilisée par Pringsheim. Par contre, il y a développement régulier si le chlorure ferrique est ajouté après stérilisation, avant le repiquage, et les cultures peuvent être repiquées en série. Il manque, dans la formule du milieu de culture telle

qu'elle est donnée, de nombreux éléments reconnus indispensables : zinc, manganèse, cuivre, etc. Ces éléments doivent se trouver sous forme d'impuretés dans les produits chimiques utilisés qui n'ont pas été purifiés spécialement. Nous avons en tout cas vérifié que l'addition au milieu de sels de ces métaux ou de la solution oligodynamique de Berthelot n'entraînait pas d'amélioration du développement. Il nous paraît donc probable que le caramel, considéré par Pringsheim comme une source de « Wuchsstoffe », agisse soit comme source de fer, soit comme solubilisant du fer, soit aussi comme source d'autres éléments et en particulier de calcium.

LES ACIDES AMINOBUTYRIQUES
CONSIDÉRÉS COMME ALIMENTS AZOTÉS POUR *Polytoma uvella*.

Les acides aminobutyriques ne semblent pas avoir été encore étudiés en tant qu'aliments azotés pour *Polytoma uvella*, non plus d'ailleurs que pour les autres flagellés oxytrophes. Cette étude pouvait fournir des documents utiles en raison de la nutrition azotée et carbonée très particulière de *Polytoma uvella*. Celle-ci a, en effet, besoin d'un aliment carboné indépendant et ne peut utiliser les acides aminés que comme aliments azotés, probablement parce que la désamination donne naissance à des composés ternaires inutilisables comme aliments carbonés. C'est ainsi que l'acide α -aminoacétique (glycocolle) est un bon aliment azoté, mais ne peut servir d'aliment carboné, alors que l'acide acétique constitue un excellent aliment carboné. Ces faits sont discutés dans des travaux antérieurs (A. Lwoff, 1932 ; A. Lwoff et H. Dusi, 1935 ; A. Lwoff, 1937).

De nouvelles expériences nous ont montré, d'une part que l'acide α -aminobutyrique se comportait comme l'acide α -aminoacétique, d'autre part que seul le dérivé α -aminé, à l'exclusion des dérivés β - et γ -aminés de l'acide butyrique normal, pouvait être utilisé comme aliment azoté.

Les expériences ont été réalisées avec une souche de *Polytoma uvella* entraînée à se développer dans un milieu où l'aliment carboné était fourni sous forme d'acide butyrique normal, qui est bien assimilé. Après un passage dans un milieu

TABLEAU II. — Nutrition de *Polystoma uoella*.

	ALIMENT AZOTÉ (en présence d'acide acétique)	ALIMENT CARBONÉ (en présence de sulfate d'ammonium)
Acide acétique		
Acide α -aminoacétique	+	+
Acide butyrique n.		0
Acide α -aminobutyrique	+	+
Acide β -aminobutyrique	0	0
Acide γ -aminobutyrique	0	0

dépourvu d'aliment azoté, pour éliminer le sulfate d'ammonium du milieu d'entretien, la souche a été repiquée dans un milieu à l'acide acétique. 4 séries de tubes ont été ensemencées :

- 1° Série témoin, sans aliment azoté ;
- 2° Acide α -aminobutyrique normal ;
- 3° et 4° Acides β - et γ -aminobutyriques normaux.

Seul le milieu à l'acide α -aminobutyrique a permis un développement des flagellés, donnant une culture moyenne de 3 à 400 organismes par millimètre cube pour une concentration d'acide aminé de 1 p. 1.000. Les dérivés β - et γ -, qui ne peuvent servir d'aliment azoté, sont dépourvus de toxicité, car, en présence de sulfate d'ammonium et de ces deux acides, le développement est normal.

L'acide α -aminobutyrique, qui constitue un aliment azoté assimilable, ne peut cependant pas être utilisé comme aliment carboné, qu'il soit offert à la fois comme aliment azoté et carboné, ou bien qu'il soit proposé aux flagellés comme aliment carboné seulement en présence d'un sel d'ammonium. Les flagellés se comportent donc vis-à-vis de l'acide α -aminobutyrique de la même façon que vis-à-vis de l'acide α -aminoacétique.

NUTRITION CARBONÉE ET OXYTROPHIE.

Alors que la grande majorité des microorganismes peuvent utiliser les acides aminés comme aliments carbonés, les flagellés Leucophytes possédant un plaste, mais dépourvus de

chlorophylle ou expérimentalement privés de la fonction chlorophyllienne, sont dénués de cette propriété. Ils manifestent le besoin d'un aliment carboné organique indépendant, qui supplée pour la synthèse des réserves glucidiques figurées (amidon et paramylon) aux produits de la photosynthèse. A. Lwoff (1932) a appelé « oxytrophie » ce type particulier de nutrition, dont une étude détaillée a été donnée dans un travail récent (1938). Les remarques que nous venons de faire sur la non-utilisation des acides aminés comme aliments carbonés nous permettent de mieux comprendre l'origine de l'oxytrophie.

Des flagellés ont perdu le pouvoir de synthétiser la chlorophylle, ou le pouvoir de l'utiliser si on les oblige à vivre à l'obscurité. Leur métabolisme nécessite donc la présence d'un aliment carboné organique. Or il se trouve que, par suite d'une spécialisation étroite, seuls quelques acides organiques peuvent être utilisés. Cette spécialisation, vraisemblablement due à une perte d'enzymes, est considérable puisque certains types, comme *Chlorogonium euchlorum*, semblent bien ne pouvoir utiliser que l'acide acétique (A. Lwoff et H. Dusi, 1935). Les acides aminés ne pourraient, bien entendu, être utilisés comme aliments carbonés que si leur désamination donnait naissance à des substances utilisables comme aliments carbonés, ce qui n'est précisément pas le cas pour les Leucophytes étudiés jusqu'ici, qui sont tous oxytropes. On peut concevoir cependant l'existence possible d'un Leucophage non oxytrophe, c'est-à-dire capable d'utiliser certains acides aminés comme aliments carbonés. Théoriquement rien ne s'y oppose et, étant donné la diversité des modalités de la nutrition et la très grande variabilité de l'équipement enzymatique qu'on rencontre chez les microorganismes, on peut s'attendre à trouver un jour cette exception.

CONCLUSIONS.

1° *Polytoma uvella* et *Polytoma obtusum* peuvent être entretenus indéfiniment dans un milieu simple où l'aliment carboné est représenté par l'acide acétique, l'aliment azoté par un sel d'ammonium.

2° Le fer est indispensable à ces deux flagellés. Un milieu alcalin additionné de chlorure ferrique avant stérilisation se comporte comme un milieu sans fer. Le chlorure ferrique peut servir de source de fer s'il est ajouté après stérilisation. Le citrate ferrique constitue une bonne source de fer.

3° Les résultats de Pringsheim, relatifs à la nécessité de caramel, sont probablement dus à ce que les milieux de culture qu'il a employés sont dépourvus de calcium et dépourvus de fer assimilable.

4° *Polytoma uvella* et *Polytoma obtusum* peuvent se développer en l'absence de tout facteur de croissance.

5° L'acide α -aminobutyrique normal est utilisable comme aliment azoté par *Polytoma uvella*. Les acides β - et γ -aminobutyriques normaux sont inutilisables.

6° Alors que l'acide butyrique constitue un bon aliment carboné pour *Polytoma uvella*, l'acide α -aminobutyrique, pas plus que les acides β - et γ -aminobutyriques, ne peuvent être utilisés comme aliments carbonés par le flagellé.

BIBLIOGRAPHIE

LWOFF (A.). *Recherches biochimiques sur la nutrition des protozoaires*. Paris, Masson, 1932.

LWOFF (A.). *Arch. f. Protistenkunde*, **90**, 1938, p. 194.

LWOFF (A.) et DUSI (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 1260 et **127**, 1938, p. 53.

LWOFF (A.) et LEDERER (E.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 971.

LWOFF (A.) et PROVASOLI (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1937, p. 279.

PRINGSHEIM (E. G.). *Beitr. z. allg. Bot.*, **2**, 1921, p. 88 et *Planta, Arch. f. wissenschaft. Bot.*, **26**, 1937, p. 665.

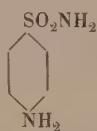
VOLKONSKY (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **105**, 1930, p. 619, 624 et 680.

L'ACTION DE LA PYRIDINE β -SULFAMIDE CONSIDÉRÉE EN RAISON DE SON ANALOGIE DE CONSTITUTION AVEC LA NICOTINAMIDE

par JEAN MATTI, FRÉDÉRIC NITTI, MADELEINE MOREL et ANDRÉ LWOFF.

(Institut Pasteur.)

INTRODUCTION. — A la suite de leurs recherches sur le mode d'action du *p*-aminophénylsulfamide (« sulfamide », 1162 F) et sur l'antagonisme exercé vis-à-vis de cette substance par divers extraits microbiens, les auteurs anglais (Mc Intosh et Withby, Stamp, Green, Woods et Fildes, Woods) sont arrivés à la conclusion suivante : le sulfanilamide prend dans les microorganismes la place d'un « métabolite essentiel », c'est-à-dire d'une substance indispensable à la multiplication. D'une façon plus précise, le sulfanilamide entre en compétition avec le métabolite pour un enzyme intervenant dans la transformation de celui-ci ; en fait, il prend la place d'une substance que Fildes et Woods, Woods, ont identifié à l'acide *p*-aminobenzoïque.



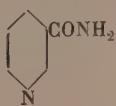
p-aminophénylsulfamide (1162 F)



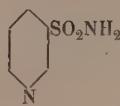
acide *p*-aminobenzoïque

A vrai dire, Woods et Fildes n'ont pas isolé l'antisulfanilamide naturel de la levure, mais les fractionnements qu'ils ont effectués ont abouti à un corps qui pouvait être l'acide *p*-aminobenzoïque et celui-ci a été essayé en raison de son analogie de constitution avec le sulfanilamide : il est effectivement doué d'un pouvoir anti-sulfanilamide considérable, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'hypothèse d'après laquelle l'action du sulfamide serait due à sa concurrence avec un

métabolite normal, concurrence rendue possible en raison de l'analogie de constitution de ces deux substances, semble pour le moment l'explication logique des faits observés. Cette hypothèse séduisante offre un grand intérêt théorique et pratique, parce qu'elle présente une explication du mode d'action d'une substance et aussi parce qu'elle ouvre une voie nouvelle aux recherches de chimiothérapie. Fondée — *a posteriori* — sur le seul exemple de l'antagonisme entre le sulfanilamide et l'acide *p*-aminobenzoïque — dont on ignorait l'existence parmi les constituants normaux des êtres vivants et dont on ignore toujours la fonction — elle méritait toutefois d'être soumise à quelques vérifications. C'est ce que nous avons commencé de faire avec la nicotinamide. La nicotinamide, en tant que constituant des coenzymes I et II, possède un rôle physiologique bien connu. On sait aussi qu'elle est un facteur de croissance pour certaines bactéries (*Staphylocoques*, Knight ; *Proteus*, Fildes, etc.), et l'on peut obtenir des bactéries carencées en nicotinamide. D'après la conception de Fildes-Woods, il était loisible de supposer que la pyridine β -sulfamide, en raison de son analogie de constitution avec la nicotinamide, pourrait prendre la place de celle-ci dans le métabolisme, comme le *p*-aminophénylsulfamide prend la place de l'acide *p*-aminobenzoïque. Si tel était le cas, on aurait pu suivre qualitativement et quantitativement les étapes de cette concurrence.



amide de l'acide nicotinique

pyridine β -sulfamide.

PARTIE EXPÉRIMENTALE. — La pyridine β -sulfamide a été préparée par le procédé de Macheck (1939). Le corps obtenu, soigneusement purifié pour éliminer toute trace de mercure, avait un point de fusion de 110-111°, comme la substance préparée par Macheck. Son action a été essayée sur 3 micro-organismes, 2 bactéries : *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*, et 1 flagellé : *Polytomella cæca*. Seuls des milieux synthétiques ont été utilisés.

1° Milieu au lactate d'ammonium pour *E. coli*.

2° Milieu au glucose + sulfate d'ammonium + nicotinamide pour *Proteus vulgaris*. La nicotinamide a été utilisée soit en excès, soit aux concentrations limites actives.

3° Milieu au sulfate d'ammonium acide acétique + aneurine pour *P. cæca*. La constitution de ce milieu a été donnée dans ces *Annales* (67, 1941, p. 9).

Quelle que soit la façon dont est effectué l'ensemencement, même si celui-ci est très faible, c'est-à-dire dans les conditions mêmes où le sulfanilamide manifeste son action, la pyridine β -sulfamide, à une concentration de 1 p. 500, est totalement dépourvue d'action inhibitrice sur les trois micro-organismes étudiés.

DISCUSSION. — Ces expériences négatives n'excluent pas, bien entendu, la possibilité d'une compétition entre pyridine β -sulfamide et nicotinamide pour un enzyme intervenant dans le métabolisme de celle-ci. Elles permettent seulement de conclure que, dans les conditions de nos essais, cette compétition n'a pu être mise en évidence pour les germes étudiés. Si le rapport affinité de la nicotinamide/affinité de la pyridine β -sulfamide est très élevé, par exemple supérieur à 50.000, on peut facilement concevoir que la pyridine β -sulfamide soit, en apparence, dépourvue d'action. Il existe, en effet, toujours de la nicotinamide dans les organismes, que celle-ci soit d'origine endogène — *E. coli*, *Polytomella cæca* — ou exogène — *Proteus vulgaris* — et le rapport concentration de nicotinamide/pyridine β -sulfamide peut être tel que le métabolisme de la nicotinamide ne soit pas troublé.

L'étude de l'inhibition par le *p*-aminophénylsulfamide a montré d'ailleurs que de nombreuses conditions étaient nécessaires pour que se manifeste l'action bactériostatique : concentration relativement élevée, ensemencement faible, absence de substances « anti ». Encore l'inhibition n'est-elle que transitoire pour beaucoup de germes. Dans un milieu de culture synthétique, une molécule d'acide *p*-aminobenzoïque peut neutraliser l'effet de 5 à 10.000 molécules de 1162 F. Si l'activité de l'acide *p*-aminobenzoïque était 10 à 20 fois plus élevée, le 1162 F serait peut-être totalement dépourvu d'action. C'est

pourquoi on ne peut tirer d'expériences négatives aucun argument contre la conception de Fildes et Woods. Mais, parce que les problèmes que celle-ci soulève du point de vue théorique comme du point de vue pratique sont très importants, un fait, même négatif, doit être versé aux débats.

La compétition entre métabolite essentiel et agent chimiothérapeutique peut n'apparaître que dans un nombre limité de cas. Le fait aujourd'hui classique qu'un même composé peut être doué d'activité vis-à-vis d'un organisme et dépourvu d'activité vis-à-vis d'un autre doit rendre extrêmement prudente toute tentative de généralisation d'un cas particulier. Il y aurait cependant grand intérêt à étudier l'action sur les micro-organismes de métabolites normaux, tels que adénine, tyrosine, tryptophane, lactoflavine, aneurine, etc., chez lesquels l'une des fonctions aurait été substituée par un groupement SO_2NH_2 ou par un autre groupement. Il est fort possible qu'en raison de la présence du métabolite normal dans l'organisme animal — métabolite normal jouant le rôle de substance « anti » — ces corps soient dépourvus de toute action thérapeutique. Mais l'étude de leur action dans des milieux synthétiques — que celle-ci soit positive ou négative — doit fournir des documents qui permettront de porter sur la conception de Fildes-Woods un jugement motivé.

CONCLUSIONS. — La pyridine β -sulfamide, étudiée en raison de son analogie de constitution avec la nicotinamide, est, en milieu synthétique, dépourvue d'action inhibitrice sur les bactéries *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris* et sur le flagellé *Polytomella cœca*.

BIBLIOGRAPHIE

FILDES (P.). *Brit. J. exp. Path.*, **21**, 1940, p. 67.

MACHEK (G.). *Monatshefte f. Chemie*, **72**, 1939, p. 90.

WOODS (D. D.). *Brit. J. exp. Path.*, **21**, 1940, p. 84.

Le complément de la bibliographie sera trouvé dans ces *Annales*, **67**, 1941, p. 9.

RECHERCHES BIOCHIMIQUES
SUR *CLOSTRIDIUM FALLAX* (W. ET S.)
ET *CLOSTRIDIUM PSEUDO-FALLAX* NOV. SPEC.

par A.-R. PREVOT et R. LOTH.

(*Institut Pasteur. Service des Anaérobies.*)

La description originale de *Clostridium fallax* avait été établie en 1915 d'après l'étude des caractères morphologiques, culturaux, pathogéniques et immunologiques de la souche « Tracol » qui constitue la souche historique de cette espèce, souche que nous possérons encore aujourd'hui. Par la suite 4 autres souches : « Lafl. », « Lard. », « Loss. » et « Br. », ont été identifiées à la souche Tracol et leur étude figure dans la Gangrène gazeuse (1918). Nous possérons encore les souches « Lard. » et « Loss. ». Postérieurement à cette date, ont été déterminées comme *fallax* plusieurs souches, dont 4 sont encore vivantes : « Ayn. », « Marc. », 123 et 209 (1). Ces souches répondent, en effet, complètement au tableau spécifique dressé par Weinberg et Séguin en 1915 (2) ainsi qu'à la description complétée par ces auteurs en 1918 (3).

Nous avons voulu voir si l'étude biochimique du métabolisme de ces 7 souches, apparemment identiques tant par leur morphologie que par leur physiologie, confirmait cette identité apparente. Nous résumons dans le tableau ci-dessous les caractéristiques biochimiques principales de ces 7 souches (produits terminaux de la fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100). La technique suivie a été la même que celle décrite dans des notes précédentes, avec vérification des résultats de la méthode de Duclaux par la séparation des acides volatils

(1) Nous remercions vivement M^{me} Guillaumie d'avoir bien voulu nous confier 6 de ces souches.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, vol. 78, 1915, p. 686.

(3) W. et S. La Gangrène gazeuse.

d'après la méthode microchimique de Behrens-Kley modifiée, et la cristallisation des acides purifiés [formiate de cérium, acétate double de sodium et d'uranium, propionate de cuivre, butyrate de cuivre, valérianates de cuivre et de zinc] (4).

On voit par ces résultats qu'il n'y a pas qu'un seul type fermentaire comme cela devrait se produire si toutes les souches appartenaient à une seule espèce bactérienne, mais bien deux types fermentaires, incontestablement distincts : le type acéto-valérianique constitué par les souches *Trac*, *Lard*, *Ayn*, et le type formo-butyrique constitué par les souches *Loss*, *Marc* 125 et 209.

L'ensemble de ces 7 souches répond donc à deux espèces nettement différentes ; l'une est l'espèce *fallax* normale, déterminée par la souche historique *Trac*, qui a été la première trouvée et a servi de base à la description originale et à laquelle nous identifions les souches *Lard* et *Ayn*. L'autre espèce est constituée par les souches *Loss*, *Marc*, 125 et 209, qui, tout en restant voisines de la première par de nombreux caractères, s'en distinguent nettement par le type fermentaire formo-butyrique. Nous proposons d'isoler cette espèce nouvelle sous le nom de *Clostridium pseudo-fallax*.

Des faits tels que ceux que nous venons d'observer permettent de poser en principe que le diagnostic spécifique des anaérobies est insuffisant si on s'en tient uniquement aux caractères morphologiques, culturaux, pathogéniques et immunologiques. Le dogme de la spécificité rigoureuse des caractères immunologiques a déjà été battu en brèche par la découverte d'antigènes communs à des espèces très éloignées les unes des autres. Il y avait donc lieu de rechercher de nouveaux critères permettant de déterminer l'espèce bactérienne avec plus de certitude. En ce qui concerne les anaérobies, qui sont avant tout des ferment, il est logique de faire entrer dans les caractéristiques obligatoires de l'espèce le type fermentaire. C'est ce à quoi s'attachent nos efforts depuis 1938, et aucun exemple ne nous a semblé plus typique que celui du groupe *fallax*.

Conclusions : *Clostridium fallax* (W. et S.) Bergey, est un ferment acéto-valérianique, qui produit en outre de l'acide

(4) PRÉVOT et LOTH. *Ann. des Fermentations*, 1941, p. 76.

Trac.	CL. <i>FALLAX</i>		CL. <i>PSEUDOFALLAX</i>		209
	Lard.	Ayn.	Loss.	Marc.	
pH terminal	5	4,5	5	4,5	5
NH ₃ pour 400 cent. cubes de culture (Foreman), en gramme	0,0306	0,306	0,272	0,034	0,017
SH ₂	0	+	0	0	0
Amines.	0	0	+	0	0
Alcool	0	0	0	0	0
Aldehydes	0	Traces.	Traces.	+	+
Cétones	0	Traces.	Traces.	+	+
Acétylméthylecarbinol.	0	0	0	0	0
Phenol.	0	0	0	0	0
Indol.	0	0	0	0	0
Scatol	0	0	0	0	0
Crésol	0	0	0	0	0
Acides fixes.	Ac. lactique.	Ac. lactique.	Ac. lactique.	Ac. lactique.	Ac. lactique.
	Valérianique 1	Valérianique 1	Valérianique 1	Butyrique 1	Butyrique 1
Acides volatils	Acétique 5	Acétique 40	Acétique 20	Acétique 4	Formique 1
Acidité volatile pour 400 cent. cubes de culture calculée en acide acétique, en gramme.	0,174	0,275	0,319	0,483	0,344
Nitrates	0,238
			Non attaqués.	0,405	0,238
			Non attaqués.	Non attaqués.	0,238
			Non attaqués.	Non attaqués.	0,238
			Non attaqués.	Non attaqués.	0,238

lactique, de l'ammoniaque, des traces d'aminés volatiles, d'aldéhyde et de cétones, et n'attaque pas les nitrates.

On a confondu dans cette espèce des souches qui morphologiquement et physiologiquement lui sont apparemment identiques et qui en réalité sont des ferment formo-butyriques produisant en outre de l'acide lactique, de l'ammoniaque, des traces d'aldéhydes et de cétones, et n'attaquant pas les nitrates. Nous individualisons ces souches en une espèce nouvelle, parente de la première mais nettement distincte : *Clostridium pseudo-fallax* n. sp.

ÉTUDE DES RADICAUX ACÉTYLES LIÉS AUX PROTÉIDES SÉRIQUES

(PREMIER MÉMOIRE)

par J. TABONE.

Les radicaux acétyles liés aux protéides sériques, dont nous avons signalé l'existence dans une publication précédente (1), peuvent jouer un rôle qui, bien que non encore élucidé, peut être important.

La chimie biologique nous offre, en effet, de nombreux exemples de substances qui doivent leurs propriétés aux groupements acétylés de leurs molécules. C'est ainsi que la choline voit son action sur la pression sanguine croître de 1 à 40.000 du fait de la fixation d'un radical acétyle sur sa molécule (2). Nous rappellerons aussi l'exemple des polyosides du pneumocoque et des haptènes de Forssman. On sait que Avery et Goebel (3) ont pu extraire du pneumocoque type I un glucide acétylé. Ce glucide absorbe complètement tous les anticorps spécifiques de l'antisérum du type homologue, immunise la souris contre l'infection à pneumocoque type I et provoque chez cet animal du purpura. Ces différentes propriétés biologiques sont en relation étroite avec la présence des groupements acétylés, puisqu'on ne les retrouve plus dans le glucide désacétylé. Plus récemment, Witebsky, Netter et Sobotka (4) ont montré qu'il existe une relation sérologique entre le polyoside acétylé du pneumocoque type I et la substance spécifique A des groupes sanguins humains. Ils ont, de plus, précisé que les radicaux acétyles liés au polyoside du pneumocoque sont indispensables à son activité comme haptène A. Au surplus, il semble bien établi que le pouvoir hapténique

(1) SANDOR et TABONE. *C. R. Ac. Sc.*, 207, 1938, p. 601.

(2) HUNT, *Journ. Pharm. and exp. Therap.*, 7, 1915, p. 305.

(3) Avery et Göbel. *Journ. exp. Med.*, 58 (2), 1933, p. 731

(4) WITEBSKY, NETTER et SOBOTKA. *Journ. exp. Med.*, **61**, 1935, p. 703.

des substances de Forssman est dû, dans tous les cas, aux radicaux acéyles fixés sur leurs molécules. En effet, Freudenberg (5) a observé sur les haptènes de Forssman, extraits de l'urine des hommes appartenant aux groupes sanguins A et AB et des organes du Porc, les mêmes faits que ceux observés par les auteurs précédents à propos de l'haptène extrait du pneumocoque. Il a démontré de plus qu'on peut régénérer le pouvoir hapténique des préparations désacétylées en les réacétylant par le cétène.

Les dérivés acétylés peuvent jouer un rôle bien différent de celui que nous venons de considérer. On sait que certains acides aminés étrangers à l'organisme sont éliminés à l'état acétylé par les urines et que ce fait, et d'autres encore, ont permis à du Vigneaud et Irish (6) de penser que, normalement, au cours de leurs synthèses, tous les acides aminés doivent passer par le stade acétylé. D'après cette hypothèse, le radical acétyle interviendrait donc dans la synthèse biologique des protéides.

Les faits et les hypothèses que nous venons de rappeler nous ont conduit à penser que la preuve que nous avons donnée de l'existence dans le sérum de cheval d'acide acétique fixé sur les protéides était digne d'attention et qu'il était d'un réel intérêt de préciser le fait observé et de tenter d'élucider le mode de liaison des radicaux acéyles avec la molécule protéïdique.

RÉPARTITION DES RADICAUX ACÉYLES DANS LA MATIÈRE VIVANTE

On serait tenté de croire, d'après l'hypothèse de du Vigneaud et Irish que le radical acétyle est répandu d'une façon universelle dans l'organisme du fait de la formation dans les tissus de dérivés acétylés des acides aminés. Ces auteurs pensent cependant que la vitesse d'hydrolyse de ces dérivés est très grande de sorte que leur concentration dans les tissus doit être extrêmement faible. En fait,

(5) FREUDENBERG. *Ann. der Chem.*, **518**, 1935, p. 97 et *Naturwiss.*, **24**, 1936, p. 522.

(6) DU VIGNEAUD et IRISH. *J. biol. Chem.*, **122**, 1937, p. 39.

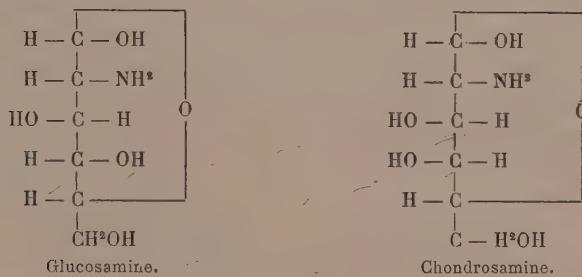
leur présence n'a été vérifiée que dans quelques cas particuliers. Par contre, il existe dans l'organisme des substances acétylées qui s'y trouvent à des concentrations plus ou moins importantes, c'est le cas de certains osides.

ETUDE DES OSSES ACÉTYLÉS.

Un grand nombre de polyosides se trouvent à l'état acétylé dans la matière vivante. Il en est ainsi pour la chitine qui forme les tissus de soutien chez les Arthropodes et de nombreux Champignons et Lichens. Ce polyoside donne par hydrolyse des quantités équivalentes de glucosamine et d'acide acétique. Il semble que sa structure soit analogue à celle de la cellulose ; l'acétylglucosamine tenant dans la chitine la place que tient le glucose dans la cellulose. Il en est ainsi, aussi, comme nous venons de le voir, pour un certain nombre de polyosides qui interviennent dans les réactions immunologiques : haptène polyosidique des pneumocoques, polyoside du bacille de Shiga, substance spécifique A des hématies des hommes des groupes sanguins A et AB, haptène de Forssman, haptène polyosidique des bacilles tuberculeux, etc... Dans ce groupe de substances on remarque encore qu'il existe un parallélisme entre la présence d'osamines et celle de l'acide acétique, sans toutefois que l'on connaisse, d'une façon certaine, la nature de la liaison de l'acide acétique avec le polyoside.

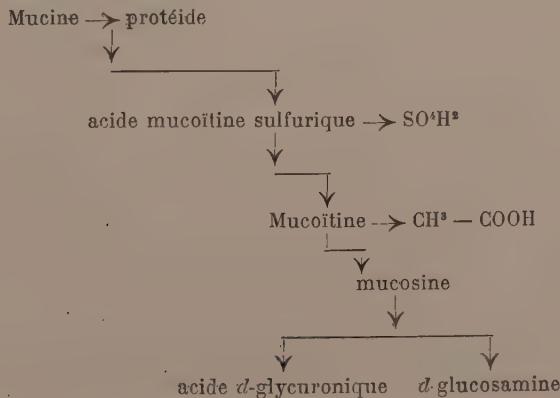
Une osamide de l'acide acétique existerait également dans un groupe de glucido-protéides isolés depuis longtemps des différents tissus et humeurs de l'organisme. Ces substances, dont la constitution est aujourd'hui connue, sont les mucines et les mucoïdes. Au premier groupe appartiennent les substances protéidiques produites par les cellules glandulaires abondantes le long du tube digestif, dans les conduits respiratoires et dans l'appareil reproducteur. Au groupe des mucoïdes qu'on appelle encore chondroglucoprotéides et aussi chondroïdes, appartiennent des substances présentes dans le cartilage, les os, la peau et les tendons. Ces deux groupes de substances ont de grandes analogies dans leurs propriétés physico-chimiques et dans leurs constitutions chimiques : en particulier, on trouve parmi leurs produits d'hydrolyse un

sucre aminé acétylé. La différence essentielle entre ces substances consiste précisément dans le fait que dans les mucines ce sucre aminé est la glucosamine, tandis que dans les mucoïdes il s'agit de la chondrosamine. Ces deux sucres sont isomères, le premier correspond au *d*-glucose, le second au *d*-galactose ; c'est-à-dire qu'ils ne diffèrent que par la rotation des atomes fixés au carbone 4 (voir formule ci-dessous) :



La constitution de la mucine a pu être établie par l'étude de ses produits d'hydrolyse. Traitée par les alcalis étendus cette substance libère d'abord un corps complexe qui renferme de l'acide sulfurique estérifié : l'acide mucoïtine sulfurique. Au cours de l'hydrolyse celui-ci se dédouble ensuite en acide sulfurique et en mucoïtine qui, à son tour, se scinde en formant de l'acide acétique et de la mucosine. Celle-ci est une combinaison moléculaire de *d*-glucosamine et d'acide glycuronique.

L'ensemble de ces réactions peut être représenté schématiquement de la façon suivante :



Ainsi la présence d'acide acétique dans les corps contenant des oses aminés semble être un fait assez général en chimie biologique ; nous la constatons dans un groupe de glucido-protéides répandus abondamment dans l'organisme animal, c'est le groupe des mucines et des mucoïdes, ainsi que dans un grand nombre de polyosides d'origine très diverse. De sorte que nous pouvons nous demander si, dans le sérum, il n'existe pas un rapport entre les glucido-protéides, dans la constitution desquels se trouvent des oses aminés, et l'acide acétique découvert par nous. Aussi avons-nous jugé utile de rappeler succinctement quelques faits relatifs aux glucido-protéides sériques.

ETUDE DES GLUCIDO-PROTÉIDES SÉRIQUES.

SÉROMUCOÏDE. — La première fraction glucido-protéidique que l'on a découverte dans le sérum semble appartenir au groupe des mucines. Il s'agit de la fraction découverte par Zannetti en 1887 (7) et appelée par lui séromucoïde. Cette substance est soluble dans l'eau et ses solutions ne sont pas coagulables par chauffage au bain-marie bouillant. Elle donne par hydrolyse des produits parmi lesquels Zannetti (8) a caractérisé l'acide sulfurique, la glucosamine et probablement l'acide acétique. En outre, selon Bywaters (9), elle a une teneur en glucides de 25 p. 100. Le séromucoïde a donc tous les caractères chimiques et physico-chimiques des mucines et, comme les mucines, il doit être acétylé. Aussi devons-nous nous poser la question de savoir s'il y a une relation entre la quantité d'acide acétique que nous avons trouvée (10) dans les protéides totaux et la quantité de séromucoïde contenue dans le sérum.

On admet généralement que la teneur du sérum en séromucoïde varie entre les limites extrêmes de 0 gr. 2 et 0 gr. 9

(7) ZANNETI. *Ann. chim. med. Farm. et Farmac.*, 25-26, 1897, p. 529.

(8) ZANNETI. *Gazzetta Italiana*, 33 (1), 1903, p. 160.

(9) BYWATERS. *Biochem. Zeit.*, 15, 1909, p. 322.

(10) Dans notre premier travail (*C. R. Ac. Sc.*, 207, 1938, p. 601) nous avions trouvé que la quantité d'acide acétique (exprimée en centimètres cubes N/20) libérée par 1 litre de sérum est de 100 cent. cubes.

par litre de sérum. Donc cette teneur est faible et la quantité d'acide acétique libérée par hydrolyse du sérum dépasse de beaucoup celle qui pourrait provenir du séromucoïde. Cependant en examinant attentivement le mode d'obtention du séromucoïde on peut se demander s'il est quantitatif. En effet ce corps est obtenu à partir du sérum privé des globulines, par précipitation au moyen du sulfate d'ammonium, puis de l'albumine, par coagulation. Ainsi une fraction plus ou moins importante du séromucoïde a pu être adsorbée, en particulier par le coagulum albuminique. Cette éventualité a été admise par Hewitt (11) dans l'un de ses travaux sur le fractionnement de la sérumalbumine. Pour cet auteur, l'albumine, telle qu'elle est préparée communément, n'est pas un protéide unique mais elle est constituée d'un mélange d'albumine cristallisante, privée de glucides, avec un glucido-protéide que Hewitt avait cru, tout d'abord, être le séromucoïde. S'il en était bien ainsi il faudrait admettre, en se basant sur les teneurs en glucides de l'albumine et du séromucoïde, que ce dernier existe dans le sérum au taux de 2 gr. 2 par litre. De sorte que 90 p. 100 du séromucoïde seraient entraînés par l'albumine au cours de la coagulation par chauffage qui précède l'isolation de la substance. Dans cette hypothèse, la quantité d'acide acétique libérée par le sérum à partir du séromucoïde ne serait plus négligeable.

Cependant, reprenant l'étude du glucido-protéide qui semble souiller l'albumine, Hewitt (12) a démontré, en comparant les teneurs en glucides et en cystine des fractions albuminiques, que ce glucido-protéide ne pouvait pas être le séromucoïde. C'est ce qui ressort de l'exemple suivant. Une fraction a été isolée dont la teneur en glucides est de 9,5 p. 100. Le séromucoïde a une teneur en glucides de 23 p. 100. Donc, dans l'hypothèse où le glucido-protéide est du séromucoïde, il faudrait admettre que cette fraction est constituée de 38 p. 100 de séromucoïde et de 62 p. 100 d'albumine cristallisante, privée de glucide. D'autre part, la teneur en cystine de l'albumine cristallisante est de 5,8 p. 100. La teneur en cystine de la

(11) HEWITT. *Biochem. Journ.*, **30** (2), 1936, p. 2229.

(12) HEWITT. *Biochem. Journ.*, **31**, 1937, p. 360.

fraction étudiée doit donc être supérieure à $\frac{62 \times 5,8}{100} = 3,6$

p. 100 qui est le taux de cystine dû uniquement à la présence de l'albumine cristallisable. Or, cette fraction renferme moins de 1,8 p. 100 de cystine. Nous pouvons donc conclure que le glucido-protéide de la sérumalbumine n'est pas le séromucoïde et que celui-ci n'est pas adsorbé par le coagulum albuminique. Le mode d'obtention du séromucoïde serait quantitatif et la teneur de ce dernier dans le sérum serait bien celle indiquée par les auteurs : elle est très faible et la quantité d'acide acétique qu'il libère ne peut représenter qu'une fraction très faible de la quantité d'acide acétique libéré par les protéides sériques totaux. Nous sommes donc autorisé à rechercher dans les fractions albuminiques et globuliniques l'origine de l'acide acétique que nous avons isolé à partir du sérum.

FRACTIONS GLUCIDIQUES DE LA SÉRUMALBUMINE.

On peut conclure de l'étude précédente que Hewitt a caractérisé dans la sérumalbumine un glucido-protéide nouveau. Hewitt a donné à ce glucido-protéide le nom de séroglycoïde. Séromucoïde et séroglycoïde diffèrent par leur constitution chimique. C'est ainsi que, tandis que le séronucoïde renferme 23 p. 100 de glucides, en dépit des multiples méthodes de fractionnement, il n'a pas été possible d'obtenir le séroglycoïde avec une teneur de plus de 10 à 11 p. 100 de glucide. Ils diffèrent aussi par leurs caractères physico-chimiques. Les solutions de l'un et de l'autre ne sont pas coagulées par chauffage. Cependant, tandis que le séroglycoïde en solution étendue et en présence d'une quantité appréciable de protéides coagulables est entraîné par ces protéides au cours de leur coagulation, le séromucoïde au contraire n'est pas entraîné dans ces mêmes conditions et c'est même, comme nous l'avons vu, par ce moyen qu'il est préparé.

Selon Hewitt le sérum de cheval aurait la composition suivante :

Globuline	3,6	p. 100
Albumine cristallisable	2,8	—
Séroglycoïde	0,3	—
Séromucoïde	0,05	—

Cependant de nouvelles fractions glucido-protéidiques ont été obtenues depuis. C'est ainsi que, plus récemment, Hewitt (13) a isolé, à partir de la fraction albuminique, un nouveau glucido-protéide qu'il a appelé Globoglycoïde. Ce protéide est une globuline. Il est obtenu en versant dans une solution d'albumine cristallisable, privée de séroglycoïde et soigneusement ajustée à pH 7,0, un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. Le précipité qui se forme constitue le globoglycoïde. La teneur de cette fraction albuminique en glucides est d'environ 5 p. 100. La quantité isolée à partir de la fraction albuminique du sérum est de 1 gramme par litre de sérum. Mais il est probable que la fraction globulinique renferme, elle aussi, une certaine quantité de globoglycoïde. Ce protéide se distingue du séro-mucoïde et du séroglycoïde par sa teneur en glucides, par ses propriétés physico-chimiques et en particulier par le fait qu'il est coagulé par chauffage au bain-marie bouillant.

Keckwick (14) a repris l'étude du fractionnement de l'albumine et a isolé deux fractions qu'il a soumises à des cristallisations successives. Il a trouvé que le rapport $\frac{\text{glucides}}{\text{azote}}$ devient rapidement constant au cours des recristallisations et que l'écart est très grand entre les valeurs des rapports des deux fractions. Keckwick a donc pu isoler deux substances cristallisées chimiquement distinctes. L'une est sans doute identique à l'albumine cristallisée de Hewitt. Elle est probablement dépourvue de glucide. L'autre a une teneur en glucide beaucoup plus faible que celle du séroglycoïde amorphe de Hewitt. Il semble, au surplus, qu'un autre glucido-protéide est éliminé au cours des recristallisations. Ce glucido-protéide aurait une teneur en glucides élevée.

TENEUR EN GLUCIDES DE LA SÉRUMGLOBULINE. — La sérumglobuline renferme, d'après Soerensen et Haugaard (15), 1,82 p. 100 de glucides exprimés en mannose-galactose et,

(13) HEWITT. *Biochem. Journ.*, 32, 1938, p. 26.

(14) KECKWICK. *Biochem. Journ.*, 32, 1938, p. 552.

(15) SOERENSEN et HAUGAARD. *Biochem. Zeits.*, 1933, p. 273.

d'après Hewitt (16), 3,3 p. 100 de glucides exprimés en galactose-mannose-glucosamine. D'ailleurs, le fractionnement de la sérumglobuline, comme celui de l'albumine, aboutit à l'isolement de fractions ayant des teneurs différentes en glucides. C'est ainsi que Hewitt (17) a comparé les teneurs en glucides de différentes fractions globuliniques. Les résultats de ce fractionnement sont reproduits ci-dessous. Ils sont exprimés en galactose-mannose pour 100 grammes de protéides.

	EUGLOBULINE I	EUGLOBULINE II	PSEUDO- GLOBULINE	GLOBO- GLYCOÏDE
Fraction la moins soluble.	4,8	2,2	1,4	
Fraction intermédiaire . .	2,4	2,8	1,7	
Fraction la plus soluble .	2,9	3,6	2,3	4,6

CONSTITUTION DU GROUPE PROSTHÉTIQUE GLUCIDIQUE DES ALBUMINES ET DES GLOBULINES. — La constitution chimique des glucido-protéides albuminiques et globuliniques n'est pas parfaitement connue. On ne sait pas, en particulier, si les glucides qu'ils renferment sont acétylés. En effet, pour séparer les glucides des protéides, on doit faire appel à des méthodes d'hydrolyse énergiques qui non seulement élimineraient les radicaux acétyles fixés éventuellement sur ces glucides, mais encore aboutissent à une destruction notable de ces derniers.

C'est ainsi que Rimington (18) sépare le groupement glucidique lié aux protéides sériques en soumettant ces protéides au traitement suivant : 100 grammes du mélange albumine-globuline sont versés dans 1 litre de solution de baryte à 10 p. 100 et le tout est maintenu à l'ébullition dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux pendant huit heures. D'ailleurs, la durée de l'hydrolyse a été jugée, par la suite, insuffisante et elle a dû être portée à trente heures, puis à trente-six heures. Le glucide est ensuite isolé de l'hydrolysat après un traitement long et pénible.

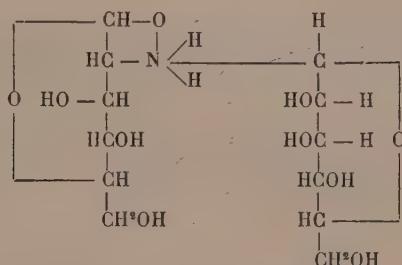
(16) HEWITT. *Biochem. Journ.*, **28**, 1934, p. 2080.

(17) HEWITT. *Biochem. Journ.*, **32**, 1938, p. 26.

(18) RIMINGTON. *Biochem. Journ.*, **25** (2), 1931, p. 1062.

Plus récemment Bierry (19) a repris l'étude de ce glucide en adoptant une méthode d'hydrolyse également énergique. Les protéides du plasma sanguin sont isolés, délipidés et mis en solution dans la soude N. La solution est portée une demi-heure à l'autoclave à 120°. Cette première hydrolyse est suivie d'une seconde, faite en présence de baryte (3 volumes de solution de baryte à 10 p. 100 pour 1 volume de solution), à l'autoclave et à la température de 120° que l'on maintient pendant une heure.

La constitution du glucide isolé selon ces techniques a été longtemps discutée. Rimington a proposé tout d'abord la formule suivante (20) :



dans laquelle une molécule de glucosamine est associée à une molécule de mannose. Cependant, à la suite des travaux de Levene et Mori (21), selon lesquels le glucide de l'ovalbumine et de l'ovomucoïde serait une dimannose-glucosamine, Rimington démontre, dans un nouveau travail (22), que la constitution du glucide des protéides sériques est identique à celle du glucide des protéides du blanc d'oeuf. Plus récemment Bierry (23) a pu mettre en évidence la présence de galactose aussi bien parmi les produits de clivage direct des albumines par les acides que parmi les produits de clivage du glucide provenant de l'attaque préalable des albumines par les alcalis dilués. Soerensen et Haugaard aboutissent à la même conclusion en étudiant des préparations très purifiées

(19) BIERRY. *C. R. Ac. Sc.*, **198**, 1934, p. 1542.

(20) RIMINGTON. *Biochem. Journ.*, **23**, 1929, p. 430.

(21) LEVENE et MORI. *J. biol. Chem.*, **84**, 1929, p. 49.

(22) RIMINGTON. *Biochem. Journ.*, **25** (2), 1931, p. 1062.

(23) BIERRY. *C. R. Acad. Sc.*, **191**, 1930, p. 1381.

de sérumalbumine. De sorte que ce glucide serait constitué de *d*-mannose, de *d*-galactose et de *d*-glucosamine. Il est bien évident que le glucide isolé, comme il a été dit plus haut, ne peut pas être acétylé, à supposer même qu'il le soit dans les protéides.

On peut conclure de ce bref exposé sur les glucides protéidiques :

1° Qu'il existe dans le sérum des osides liés aux protéides. Dans la constitution de ces osides entrent, entre autres, des oses aminés. L'un, celui du séromucoïde, a une constitution voisine de celle du groupement prosthétique des mucines, l'autre renferme du *d*-mannose, du *d*-galactose et de la *d*-glucosamine.

2° Le groupement prosthétique du séromucoïde est très probablement acétylé, mais aucun fait ne prouve que le second le soit aussi.

3° La teneur du sérum en séromucoïde étant minime, la quantité d'acide acétique provenant de ce glucido-protéide est elle-même très petite.

DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE LIÉ AUX PROTÉIDES SÉRIQUES

Le premier problème que nous avons eu à résoudre est celui du dosage des acides volatils fixés sur les protéides sériques. Ce problème comprend en réalité deux parties : la mise en liberté de l'acide et son entraînement.

Les techniques d'entraînement des acides volatils qui ont été proposées par différents auteurs sont toutes basées sur un principe très simple et le dispositif adopté répond en général parfaitement au but proposé. A notre tour, nous présenterons un dispositif inspiré de ceux décrits par les auteurs qui ont étudié cette question avant nous-même.

La mise en liberté de l'acide par hydrolyse présente, par contre, des difficultés beaucoup plus grandes. De nombreux auteurs ont étudié la question et ont proposé des solutions de valeurs inégales. Nous nous sommes attaché avec un soin particulier à l'étude critique des diverses techniques adoptées

avant nous. Quelques-unes d'entre elles se sont révélées inacceptables, d'autres ont pu être adaptées au cas qui nous intéresse.

A. — Exposé de quelques techniques de dosage des acides volatils liés aux substances biologiques.

I. — DOSAGE DES ACIDES VOLATILS FIXÉS SUR LES COMPOSÉS ORGANIQUES.

La libération des acides volatils, fixés sur les composés organiques sous forme d'esters alcooliques, phénoliques, thioliques ou sous forme d'amide, peut se faire soit par hydrolyse alcaline, soit par hydrolyse acide. De plus, différents acides et différentes bases peuvent être utilisés comme agents d'hydrolyse.

Dans certaines techniques, l'acide libéré est dosé dans l'hydrolysat même, ces techniques ne peuvent être appliquées que dans des cas très particuliers.

Nous n'envisagerons dans cet exposé que les méthodes dans lesquelles les acides volatils, libérés par hydrolyse, sont entraînés par la vapeur d'eau avant d'être dosés ; elles sont d'une application très générale.

EXPOSÉ HISTORIQUE DES TECHNIQUES. — Une des premières méthodes basée sur ce principe et qui a servi de point de départ à l'élaboration des autres techniques, est la méthode de Wenzel (24).

Wenzel a adopté comme agent d'hydrolyse l'acide sulfurique et a appliqué sa méthode au dosage de l'acide acétique fixé sur différents composés organiques.

L'appareil utilisé est constitué par un premier ballon muni de trois tubulures : l'une est terminée par un entonnoir à robinet, une autre est constituée par un tube capillaire arrivant jusqu'au fond du ballon et pouvant être mis en relation avec un appareil producteur d'hydrogène, la troisième tubulure est réunie à un réfrigérant légèrement ascendant. Ce

(24) HOUBEL-WEYL. *Die Methoden der organischen Chemie*, p. 30.

réfrigérant est terminé par un tube coudé qui arrive jusqu'au fond d'un deuxième ballon rempli de billes de verre. Celui-ci est réuni à un deuxième réfrigérant dont l'extrémité s'engage dans une fiole conique qui peut être mise en relation avec une trompe à vide. Cette fiole renferme une quantité connue de solution de potasse N/10 et est destinée à recevoir le distillat.

Dans le premier ballon on introduit 0 gr. 4 de substance acétylée puis, par l'entonnoir, 3 c. c. 5 d'acide sulfurique à 50 p. 100. Ce ballon est maintenu dans un bain-marie jusqu'à la fin de l'hydrolyse. On introduit alors par l'entonnoir 20 cent. cubes d'eau bouillante et on distille à nouveau.

L'auteur a constaté que la concentration en acide sulfurique la plus favorable correspond à celle indiquée ; parfois cependant on a utilisé des concentrations moindres. De toute façon, on fait généralement un essai préliminaire pour déterminer la concentration optimum. A cette concentration, on ne doit pas observer une coloration trop forte et une formation trop abondante d'anhydride sulfureux.

L'auteur titre dans le distillat d'abord l'acidité totale en présence de phénolphthaléine, puis, iodométriquement l'acide sulfureux. La différence entre ces deux déterminations représente l'acidité due à l'acide acétique.

Plus récemment Freudenberg (25) a mis au point une technique de dosage qui utilise comme agent d'hydrolyse l'acide paratoluènesulfonique. Cet auteur a décrit un nouveau dispositif et a donné les résultats relatifs à une série de composés acétylés : l'hexacétylmannite, l'octacétylcellulose, le pentacéthylglucose, etc... ; les résultats obtenus par l'auteur sont satisfaisants.

Pregl et Soltys (26) ont entrepris l'étude critique des deux techniques qui viennent d'être décrites sur un certain nombre de composés acétylés.

Ces auteurs constatent que la technique de Wenzel permet d'obtenir des valeurs qui sont apparemment exactes pour un certain nombre de substances. Ils remarquent cependant que

(25) FREUDENBERG. *Z. angew. Chem.*, **38** (5), 1925, p. 280.

(26) PREGL et SOLTYS. *Mikrochemie*, 1929, p. 1.

dans le domaine des glucides, et dans le cas d'autres substances aussi, cette méthode conduit à des résultats trop élevés. L'erreur proviendrait de l'action secondaire qu'exerce l'acide sulfurique sur ces substances au cours de l'hydrolyse et qui aboutit à la formation d'acides volatils qui distillent ensuite en même temps que l'acide acétique libéré.

Par contre, l'action de l'acide paratoluènesulfonique serait nettement plus délicate que celle de l'acide sulfurique et on aboutirait ainsi à des résultats exacts dans le dosage de l'acide acétique fixé sur les glucides. Cependant, de même que l'acide sulfurique, l'acide paratoluènesulfonique donne naissance, au cours de l'hydrolyse, à de l'anhydride sulfureux en quantité, il est vrai, beaucoup moins grande. Dans leurs premiers travaux Pregl et Soltys ont suivi les indications de Wenzel et ont dosé iodométriquement l'anhydride sulfureux présent dans le distillat. Par la suite, ils ont proposé une modification très ingénieuse : plutôt que de doser l'anhydride sulfureux formé au cours de l'hydrolyse, ils le retiennent en faisant passer les vapeurs dans un tube en U rempli de billes de verre mouillées avec une solution tampon de phosphate. Ce tube en U est placé entre le ballon où a lieu l'hydrolyse et le réfrigérant, il porte sur une longueur de 3 centimètres une bourre de coton de verre permettant de retenir le phosphate qui pourrait être entraîné vers le réfrigérant.

Pregl et Soltys jugent nécessaire d'éliminer le gaz carbonique qui se trouve dans le distillat. Dans ce but le distillat est acidifié avec de l'acide chlorhydrique, ajouté en quantité connue et est porté à l'ébullition pendant vingt secondes. Dans ces conditions, le gaz carbonique est chassé complètement sans qu'il y ait perte d'acide acétique.

Les conditions d'hydrolyse sont les suivantes : pour une prise d'essai de 5 milligrammes de substance on utilise 1 cent. cube d'une solution d'acide paratoluènesulfonique à 25 p. 100. On poursuit l'hydrolyse pendant vingt à quarante minutes suivant la nature de la liaison du groupement acétylé. L'hydrolyse se fait à 100°.

On donne les résultats d'analyse de l'heptacétylméthylgentiobiose, de l'octacétylgentiobiose et de la pentacétylcatechine. L'erreur est inférieure à $\pm 0,05$ p. 100.

Le problème du dosage des acides volatils fixés sur les substances organiques a été repris plus récemment par Kuhn et Roth (27). Ces auteurs ont étudié les conditions d'hydrolyse et d'entraînement des radicaux acétyles et benzoyles. Ils ont également appliqué leur technique au dosage du radical méthyle fixé sur les chaînes carbonées. Les substances étudiées sont : le pentacétylglucose, l'hexacétylmannite, l'acétanilide, l'acétylglycocolle, etc...

L'intérêt de ce travail réside surtout dans le fait que ces auteurs ont réalisé, en même temps que l'hydrolyse acide, l'hydrolyse alcaline des dérivés acétylés rendant ainsi aisée l'étude d'un grand nombre de composés dont l'hydrolyse acide est très lente. Les agents d'hydrolyse utilisés sont l'acide sulfurique à 50 p. 100 et l'acide paratoluènesulfonique à 23 p. 100 dans le cas de l'hydrolyse acide, et dans le cas de l'hydrolyse alcaline, soit une solution aqueuse de soude 5 N, soit une solution N de soude dans l'alcool méthylique. De plus, on propose un dispositif plus simple que ceux déjà décrits : l'appareil est constitué essentiellement d'un ballon à 3 tubulures semblable à celui utilisé par Wenzel et d'un réfrigérant adapté à une tubulure du ballon. Ce réfrigérant par simple rotation autour de l'axe de la tubulure peut fonctionner, soit à reflux au cours de l'hydrolyse, soit comme réfrigérant descendant au cours de l'entraînement. L'entraînement des acides volatils se fait à la pression atmosphérique.

Enfin ces auteurs estiment qu'on peut éviter de doser l'anhydride sulfureux qui passe dans le distillat. Il suffit, en effet, de porter le distillat à l'ébullition pendant sept à huit secondes pour éliminer en même temps que le gaz carbonique, l'anhydride sulfureux qui le souille.

Il est remarquable de constater que les résultats publiés concordent d'une façon très satisfaisante, quel que soit l'agent d'hydrolyse utilisé. On n'observe en particulier aucune différence sensible dans le comportement des glucides acétylés, vis-à-vis de l'acide sulfurique et de l'acide paratoluènesulfonique. Ces résultats s'opposent ainsi aux conclusions de l'étude critique de Pregl et Soltys.

(27) KUHN et ROTH. *Berichte Gesells.*, 66 (2), 1933, p. 274.

Nous verrons enfin qu'à la suite de Kuhn et Roth, d'autres chercheurs et nous-même avons adopté le principe de l'hydrolyse alcaline pour l'étude des dérivés acétylés présents dans les milieux biologiques complexes et avons abouti à des résultats contradictoires. Nous nous proposons de faire la critique de cette méthode et d'y apporter des modifications importantes.

II. — QUELQUES EXEMPLES D'APPLICATION
DES TECHNIQUES PRÉCÉDENTES AU DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE
DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES ACÉTYLÉS.

Les principes des méthodes que nous venons de rappeler ont été adoptés par les auteurs qui se sont proposé de doser l'acide acétique dans différentes substances acétylées présentes dans les milieux biologiques plus ou moins complexes.

Avery et Goebel ont caractérisé et dosé l'acide acétique de l'acétylpolyoside du pneumocoque (28) en hydrolysant la solution du polyoside par un volume égal de soude N, pendant quarante minutes, au bain-marie bouillant. Après acidification par l'acide sulfurique l'hydrolysat est distillé dans le vide. Le distillat est recueilli dans un flacon contenant une suspension de carbonate d'argent fraîchement préparé. Par la suite on sépare le sel d'argent soluble formé, de l'excès de carbonate d'argent. Des poids respectifs du sel d'argent et de l'iodure d'argent formé à partir de ce sel on a déduit que l'acide isolé était l'acide acétique.

K. Meyer et J. Palmer (29) dans leurs travaux sur les polyosides de l'humeur vitreuse ont dosé l'acide acétique fixé sur ces polyosides en utilisant la méthode de Kuhn et Roth légèrement modifiée. Les premiers résultats publiés par ces auteurs ont été obtenus en hydrolysant les substances extraites de l'humeur vitreuse au moyen d'une solution alcoolique de soude. Ils ont abouti à la conclusion que la substance renferme deux radicaux acétyles par équivalent. Cependant, poursuivant leurs travaux (30), ces mêmes auteurs ont constaté qu'en substituant, comme agent d'hydrolyse, l'acide paratoluène-

(28) AVERY et GOEBEL. *J. exper. Med.*, **58** (2), 1933, p. 731.

(29) K. MEYER et J. PALMER. *J. biol. Chem.*, **107**, 1934, p. 629.

(30) K. MEYER et J. PALMER. *J. biol. Chem.*, **114**, 1936, p. 689.

sulfonique à la soude, le polyoside paraissait ne plus posséder qu'un seul radical acétyle par équivalent.

Par la suite, K. Meyer et J. Palmer ont adopté définitivement l'acide paratoluènesulfonique dans l'hydrolyse des polyosides, en particulier de ceux isolés du cordon ombilical.

A leur tour Herriot et Northrop (31) ont utilisé l'hydrolyse alcaline pour doser l'acide acétique des dérivés acétylés de la pepsine. La technique adoptée est la suivante : on sépare la pepsine par précipitation au moyen d'une solution d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Après plusieurs lavages à l'eau le précipité est dissous dans un peu d'alcali ou de phosphate de soude. Cette solution est hydrolysée au moyen d'une solution de soude 4 N, à la température de 35° pendant au moins cinq jours. Après acidification, au moyen de l'acide phosphorique, l'hydrolysat est distillé et le résidu soumis à trois entraînements successifs.

Dans d'autres essais, les auteurs ont hydrolysé les dérivés acétylés de la pepsine à la température de 100° pendant cinq jours avec une solution de soude 0,4 N. Ils ont également adopté l'hydrolyse acide, au moyen de l'acide paratoluènesulfonique à 25 p. 100, à la température de 100° pendant six heures.

Ces trois méthodes n'ont pas donné des résultats identiques. Ceux correspondant à l'hydrolyse alcaline faite à 100° sont supérieurs à ceux correspondant à l'hydrolyse alcaline à 35° et à l'hydrolyse acide.

Les auteurs attirent l'attention sur les inconvénients qui résultent de l'emploi de l'acide trichloracétique pour l'isolation de la pepsine. Ils ont constaté, en effet, que cet acide se fixe en quantité très faible sur le protéide, très probablement en se combinant à un groupement NH² libre. L'acide ainsi fixé échappe aux lavages du précipité et distille par la suite, en même temps que l'acide acétique.

Byron, Hendrix et Paquin (32), dans un travail sur l'action des alcalis sur les protéides acétylés ont également utilisé l'hydrolyse alcaline pour libérer l'acide acétique qui a été

(31) HERRIOT et NORTHRUP. *Journ. gen. Physiol.*, **18**, 1935, p. 36.

(32) BYRON, HENDRIX et PAQUIN. *J. biol. Chem.*, **124**, 1938, p. 35.

fixé sur le protéide. L'hydrolyse a été faite au moyen de la soude N, à la température de 100°, pendant six heures dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux.

Les auteurs attirent l'attention sur l'erreur qui résulte de la formation d'hydrogène sulfuré au cours de l'hydrolyse des protéides. Ils proposent de précipiter l'hydrogène sulfuré dans l'hydrolysat même par addition d'un excès de litharge. Le sulfure de plomb et l'excès de litharge sont ensuite éliminés par filtration.

De plus ils jugent nécessaire de pratiquer l'entraînement de l'acide acétique sur les protéides préalablement précipités par addition au filtrat d'une solution de tungstate de sodium à 10 p. 100.

Dans une note (33) où nous avons signalé, pour la première fois, la présence d'acide acétique fixé sur les protéides du sérum de cheval, nous avons indiqué très brièvement les conditions de dosage adoptées. Nous tenons à les rappeler ici et à préciser en même temps quelques détails de la technique employée. Ces détails, que nous n'avions pas jugé utile de mentionner dans notre communication, se sont révélés par la suite très importants. Ils nous ont permis, comme nous le verrons dans la partie critique de cette étude, d'aboutir à des conclusions exactes du point de vue qualitatif sans toutefois que le principe de la méthode utilisée soit à l'abri de nombreuses critiques.

L'hydrolyse des protéides sériques a été faite à la température de 37° en présence de soude 0,4 N et a été prolongée pendant quatre à cinq jours. On acidifiait ensuite l'hydrolysat par addition d'acide citrique à 50 p. 100 et on entraînait l'acide volatil. On pratiquait en général trois à quatre entraînements après addition de 10 cent. cubes d'eau environ. Nous avons trouvé ainsi que la quantité d'acide volatil libérée par 100 cent. cubes de sérum correspond environ à 10 cent. cubes d'acide N/20.

L'étude des courbes de Duclaux, la détermination du coefficient de partage relatif au système eau-éther, ainsi que la pesée des cendres après neutralisation nous ont permis de

(33) G. SANDOR et J. TABONE. *C. R. Acad. Sc.*, **207**, 1938, p. 601.

conclure que l'acide volatil était l'acide acétique. Ces mesures ont été faites à partir d'une quantité assez notable de sérum hydrolysé comme il vient d'être indiqué. Par la suite, l'hydrolysat n'a subi que deux entraînements. Le distillat obtenu a été, après alcalinisation, concentré à faible volume puis acidifié et distillé à nouveau sans que le résidu ait été soumis à d'autres entraînements par la vapeur d'eau.

Par le fait des deux distillations successives, dans chacune desquelles nous n'avons recueilli que les fractions de tête, nous avons pu laisser dans les résidus, en même temps qu'une quantité non négligeable d'acide acétique, la majeure partie d'un acide moins entraînable que l'acide acétique.

Dans une communication plus récente (34) nous avons établi les courbes d'hydrolyse, en fonction du temps de différents échantillons de sérums plus ou moins acétylés sous l'action du cétène. Dans ce travail nous avons également adopté l'hydrolyse alcaline mais en nous plaçant dans des conditions de concentration et de température différentes de celles adoptées précédemment. Nous avons opéré en solution sodique N/2 à la température du bain-marie bouillant. De plus, pour déterminer la quantité d'acide acétique fixé sur les protéides par acétylation nous avons établi les différences entre les quantités d'acides entraînables contenues dans le sérum avant et après acétylation, en opérant pour l'un et pour l'autre dans des conditions rigoureusement identiques.

B. — Etude critique des techniques de dosage des acides volatils fixés sur les substances biologiques.

Dans l'exposé qui précède nous avons vu que les auteurs ont adopté indifféremment l'hydrolyse acide et l'hydrolyse alcaline pour libérer les acides volatils fixés sur les substances biologiques (polyosides, protéides).

Dans l'étude qui suit nous examinerons l'action des agents d'hydrolyse sur les principaux éléments participant à la constitution des protéides et sur les protéides sériques. A partir des conclusions de cette étude nous établirons la technique

(34) G. SANDOR et J. TABONE. *Bull. Soc. chim. biol.*, 21, 1939, p. 1254.

qui sera adoptée dans ce travail pour le dosage de l'acide acétique lié aux protéides sériques.

1° COMPORTEMENT DES SUCRES
VIS-A-VIS DES AGENTS D'HYDROLYSE.

Nous avons vu, dans la partie historique de ce travail, que les glucido-protéides sériques libèrent, par hydrolyse, du *d*-galactose, du *d*-mannose et de la *d*-glucosamine. Ces sucres subissent ensuite l'action des agents d'hydrolyse qui les ont libérés. Nous n'envisagerons ici que le comportement du glucose vis-à-vis des agents d'hydrolyse.

a) ACTION DES ALCALIS SUR LES SUCRES. — L'action des alcalis sur les sucres est bien connue. Elle se fait sentir déjà quand la concentration en ions OH⁻ est faible et à la température ordinaire. On observe alors que les modifications α et β atteignent instantanément leur état d'équilibre. A une concentration alcaline plus élevée le sucre se transforme en un mélange d'isomères. Ainsi le *d*-glucose, le *d*-mannose et le *d*-fructose se transforment les uns dans les autres et on a toujours un mélange des trois. A température plus élevée le phénomène change et si on fait bouillir une solution étendue du glucose avec KOH (N/40 à N/100) on obtient du méthylglyoxal qui distille et de l'aldéhyde glycérique qui reste dans le résidu. A une concentration plus élevée encore (dans de la soude à 5 p. 100 ou à 10 p. 100) il y a formation d'acide lactique. L'acide lactique sera donc normalement présent dans les hydrolysats alcalins des substances biologiques, dans la constitution desquelles interviennent des oses, quand l'hydrolyse aura lieu à une température assez élevée et pour des concentrations en ions OH⁻ assez grandes. Ces conditions sont voisines de celles adoptées par de nombreux auteurs et par nous-même pour doser l'acide acétique fixé sur des polyosides ou sur des protéides. Nous avons donc jugé utile d'étudier ici le comportement de l'acide lactique au cours de l'entraînement des acides volatils par la vapeur d'eau, d'adopter une méthode de destruction de l'acide lactique et de vérifier, enfin, si ce dernier acide est le seul qui se forme au cours du traitement du glucose par les alcalis.

Entraînement de l'acide lactique par la vapeur d'eau. — L'expérience suivante nous montre le comportement de l'acide lactique au cours de l'entraînement des acides volatils par la vapeur d'eau. 30 cent. cubes d'une solution d'acide lactique équivalant à 5 c. c. 10 d'une solution acide N/20 sont placés dans le ballon de l'appareil qui sera décrit dans le chapitre suivant (voir page 276). On soumet la solution à dix entraînements successifs par la vapeur d'eau. Chaque entraînement se fait à partir du deuxième par introduction de 10 cent. cubes d'eau dans le ballon et est poursuivi jusqu'à ce que le volume du liquide restant soit d'environ 3 à 4 cent. cubes. Nous avons trouvé dans le distillat, après la première distillation : 7 p. 100 de l'acidité totale ; après la deuxième : 11 p. 100 ; après la troisième : 23 p. 100 ; après la quatrième : 30 p. 100 ; après la cinquième : 36 p. 100 ; après la dixième : 37 p. 100.

A titre de comparaison nous avons répété les mêmes expériences avec une solution d'acide acétique : 30 cent. cubes d'une solution correspondant à 5 c. c. 10 d'une solution acide N/20 sont soumis à des entraînements par la vapeur d'eau dans des conditions identiques à celles de l'expérience précédente. Nous avons trouvé après le premier entraînement 71 p. 100 de l'acidité totale ; après le deuxième : 94 p. 100 ; après le troisième : 98 p. 100 ; après le quatrième : 100 p. 100.

De ces deux expériences nous pouvons conclure que l'acide lactique, lorsqu'il est présent dans les hydrolysats provenant de milieux biologiques acétylés, intervient pour fausser le dosage de l'acide acétique (*). Cependant l'acide lactique est

(*) A ce propos nous pouvons mentionner que dans notre premier travail nous devions être en présence d'un mélange d'acide acétique et d'acide lactique. En effet, nous avons effectué une hydrolyse alcaline du serum dialysé et les protéides sériques contiennent des glucides. Ceux-ci étaient donc transformés en partie en acide lactique. Pourtant, d'après les courbes de Duclaux et le coefficient de partage, ainsi que d'après la détermination du poids des cendres, il s'agissait manifestement de l'acide acétique pratiquement pur. Comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent (voir p. 266), pour effectuer ces études physico-chimiques nous n'avons utilisé que les premières portions des distillats, de sorte que la solution étudiée ne devait contenir qu'une très faible fraction de l'acide lactique présent dans l'hydrolysat alcalin.

détruit facilement par les agents oxydants à action relativement modérée sans que l'acide acétique soit touché dans les mêmes conditions.

Destruction de l'acide lactique. — Les méthodes de destruction spécifique de l'acide lactique sont nombreuses. Exposé à l'action des rayons ultra-violets, l'acide lactique se décompose avec formation de gaz carbonique accompagné de traces d'oxyde de carbone (35). L'acide lactique est oxydé à l'état d'acétaldéhyde par le permanganate en présence de sulfate manganeux qui rend la réaction quantitative. C'est là le principe d'une méthode de dosage de l'acide lactique. A ces méthodes nous avons préféré, pour différentes raisons, la méthode de Friedermann (36). Cet auteur propose de détruire l'acide lactique et l'acide pyruvique qui souillent souvent les distillats des acides volatils provenant des cultures bactériennes, en soumettant ces distillats à l'action de l'oxyde rouge de mercure en présence de l'acide sulfurique et du sulfate de magnésie à la température de l'ébullition. Dans ces conditions, en même temps que l'acide lactique, sont détruits l'acide pyruvique, l'acide formique et l'acide crotonique.

Nous avons vérifié la méthode de Friedermann en ce qui concerne l'acide lactique : dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux nous avons introduit 50 cent. cubes d'une solution d'acide lactique équivalant à 5 c. c. 04 d'une solution acide N/20, puis 0 gr. 50 d'oxyde rouge de mercure, 20 grammes de sulfate de magnésie et 2 cent. cubes d'acide sulfurique à 50 p. 100. Le mélange est porté à l'ébullition pendant trente minutes, puis soumis à la distillation sous pression réduite jusqu'à début de cristallisation. Nous avons pratiqué trois entraînements supplémentaires. Nous avons retrouvé dans le distillat 12 p. 100 de l'acidité initiale. Après avoir renouvelé sur ce distillat le traitement qui vient d'être indiqué nous avons pu constater que la destruction de l'acide lactique était totale.

Donc, dans les conditions dans lesquelles opère Friedermann la destruction de l'acide lactique est complète, tout au

(35) BURNS. *J. Amer. Chem. Soc.*, **51**, 1929, p. 3165.

(36) FRIEDERMANN. *J. biol. Chem.*, **123**, 1938, p. 161.

moins si l'on effectue deux distillations successives en présence d'oxyde rouge de mercure.

Application aux solutions de glucose. — Nous avons dissous 0 gr. 10 de glucose dans 20 cent. cubes de soude N/2. La solution alcaline est placée dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux. On maintient le ballon pendant huit heures dans un bain-marie à l'ébullition. La solution est ensuite acidifiée par addition de 10 cent. cubes de solution d'acide citrique à 50 p. 100 et est soumise à l'entraînement par la vapeur d'eau. Nous avons trouvé que le distillat correspond à 6 c. c. 80 d'une solution acide N/20. Nous avons traité le distillat précédent suivant la technique de Friedermann. Après une première destruction le distillat correspond à 2 c. c. 20 et après une deuxième destruction le nouveau distillat correspond à 1 c. c. 63 de solution acide N/20.

Ainsi il se forme au cours du traitement du glucose par les alcalis des acides entraînables par la vapeur d'eau autres que l'acide lactique et résistant à l'action de l'oxyde mercurique ou formant par oxydation des composés acides et entraînables par la vapeur d'eau. Dans cette expérience le taux de ces acides est d'environ 23 p. 100 de l'acidité totale.

Nous pouvons donc conclure que les méthodes utilisant l'hydrolyse alcaline ne peuvent fournir que des résultats approchés. L'erreur sera d'autant plus grande que la quantité de sucre présent dans les milieux biologiques sera, elle-même, plus élevée.

b) ACTION DES ACIDES SUR LES SUCRES. — Les solutions étendues d'acide sulfurique et d'acide chlorhydrique décomposent les hexoses en un mélange d'acide lévulique et d'acide formique. Nous pouvons donc conclure que l'hydrolyse par l'acide sulfurique adoptée par certains auteurs conduit certainement à des résultats erronés, de sorte que nous n'avons examiné dans ce qui suit que l'action de l'acide paratoluènesulfonique sur les sucres. Nous avons déjà vu que de nombreux auteurs ont adopté ce dernier acide comme agent d'hydrolyse.

Action de l'acide paratoluènesulfonique sur le glucose. — 0 gr. 10 de glucose sont dissous dans 20 cent. cubes de solution N/2 d'acide paratoluènesulfonique. Cette solution est

maintenue au bain-marie bouillant pendant huit heures, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux. Puis les acides volatils formés sont entraînés par la vapeur d'eau. Les résultats obtenus sont les suivants :

Le distillat correspond à 0 c. c. 20 d'acide N/20. Ce distillat après traitement par l'oxyde mercurique ne renferme plus d'acides volatils.

Nous pouvons donc conclure que l'acide paratoluènesulfonique ne réagit pas sur les sucres en formant à partir de ces derniers des acides entraînables par la vapeur d'eau. La faible quantité d'acide présent dans le premier distillat, constituée, sans doute, par de l'anhydride sulfureux provenant d'une réduction partielle de l'acide paratoluènesulfonique par le glucose, est complètement détruite au cours de l'oxydation par l'oxyde de mercure.

2° COMPORTEMENT DES ACIDES AMINÉS VIS-A-VIS DES AGENTS D'HYDROLYSE.

Le problème qui se pose ici est celui d'une désamination éventuelle des acides aminés sous l'action des agents d'hydrolyse, désamination qui conduirait à la formation d'acides entraînables.

Les faits relatifs à la désamination du glycocolle sont contradictoires. C'est ainsi que Hirschstein (37) a soutenu qu'après plusieurs jours de contact, avec la potasse à 1 p. 100 ou 5 p. 100, le glycocolle ne peut plus être retrouvé par la méthode au chlorure de β -naphtalènesulfonique. Au contraire, Abderhalden et Guggenheim (38) prétendent que le glycocolle résiste à un tel traitement et que, même par ébullition avec la potasse à 33 p. 100, le glycocolle ne perd pas d'ammoniaque.

Nous avons pu vérifier que le glycocolle ne donne naissance à aucun acide entraînable par la vapeur d'eau quand il se trouve placé dans les conditions adoptées dans ce travail pour l'hydrolyse des protéides sériques.

Nous mentionnerons ici le comportement de la cystéine qui,

(37) HIRSCHSTEIN. *Arch. f. exper. Path. u. Pharm.*, **59**, p. 401.

(38) ABDERHALDEN et GUGGENHEIM. *Zeit. phys. Chem.*, **59**, p. 29.

traitée dans ces mêmes conditions, donne un premier distillat très faiblement acide ; cet acide est détruit par oxydation au cours du traitement par l'oxyde de mercure. Il s'agit d'acide sulfhydrique provenant du groupe sulfhydrilé de la molécule.

3° COMPORTEMENT DES PROTÉIDES SÉRIQUES VIS-A-VIS DES AGENTS D'HYDROLYSE.

De l'étude qui précède nous pouvons conclure que les hydrolysats sériques contiennent des acides entraînables par la vapeur d'eau qui proviennent de la destruction des éléments constituant les protéides et que la quantité de ces acides dépend des conditions d'hydrolyse. Ces conclusions sont confirmées par l'expérience suivante. Des prises d'essai de 10 cent. cubes d'un même sérum préalablement dialysé sont hydrolysées par un volume égal de solution de soude N et de solution d'acide paratoluènesulfonique N et à 50 p. 100. Les hydrolyses sont faites à volume constant et à 100°. Les entraînements par la vapeur d'eau sont faits dans l'appareil et selon la technique que nous décrirons au chapitre suivant. On dose les distillats provenant de l'hydrolysat (premier distillat) et celui provenant de la distillation du précédent distillat dosé puis traité par l'oxyde rouge de mercure selon la méthode de Friedermann (deuxième distillat). Les résultats sont reproduits dans le tableau I.

Cette expérience confirme les expériences précédentes sur le comportement des sucres et des acides aminés vis-à-vis des agents d'hydrolyse. On remarquera que la quantité d'acides volatils oxydés par l'oxyde rouge de mercure est faible dans les distillats provenant des hydrolyses par l'acide paratoluène-sulfonique tandis qu'elle est grande dans ceux provenant des hydrolyses par la soude. De plus, la quantité d'acides volatils résistant à l'action de l'oxyde rouge de mercure est constante dans le cas de l'hydrolyse avec l'acide paratoluènesulfonique à 50 p. 100 quand l'hydrolyse est prolongée au delà de quatre heures ; cette quantité est cependant plus faible que la quantité d'acide correspondant provenant de l'hydrolyse avec la soude N pour une durée de dix-sept heures. Cet écart doit être attribué à l'action de la soude sur les sucres protéïdiques,

TABLEAU I.

AGENTS D'HYDROLYSE	DURÉE de l'hydrolyse	ACIDITÉ DES DISTILLATS exprimée en centimètres cubes N/20		
		1 ^e distillat	2 ^e distillat	Déférence
<i>Soude :</i>				
10 cent. cubes de solution N.	7 h. 40 m.	4,40	2,20	1,90
10 cent. cubes de solution N.	17 h.	7,48	3,85	3,33
<i>Acide paratoluènesulfonique :</i>				
10 cent. cubes de solution N.	8 h. 20 m.	2,20	2,07	0,13
10 cent. cubes de solution à 50 p. 100.	1 h.	2,48	1,90	0,28
10 cent. cubes de solution à 50 p. 100.	4 h.	2,58	2,35	0,23
10 cent. cubes de solution à 50 p. 100	8 h.	2,65	2,32	0,33

action qui, comme nous l'avons montré, aboutit à la formation d'acides entraînables par la vapeur d'eau autres que l'acide lactique et sur lesquels l'oxyde rouge de mercure est sans effet.

CONCLUSIONS.

Cette étude nous permet de conclure que les éléments des protéides et des polyosides placés dans les conditions qui sont celles adoptées par de nombreux auteurs pour doser les acides volatils fixés sur ces dernières substances donnent naissance à des acides volatils qui souillent le distillat. Dans le cas de l'hydrolyse alcaline la quantité d'acides volatils ainsi formés est relativement considérable, de plus une partie non négligeable de ces acides n'est pas détruite par l'oxyde rouge de mercure. Par contre, dans le cas de l'hydrolyse acide, au moyen de l'acide paratoluènesulfonique, la quantité d'acides volatils résultant des réactions secondaires est toujours minime ; de plus ces acides sont entièrement détruits au cours du traitement par l'oxyde rouge de mercure. Ces résultats sont confirmés par l'étude des hydrolysats sériques.

Ainsi nous sommes conduit à employer finalement l'acide

paratoluènesulfonique comme agent d'hydrolyse et à rejeter l'emploi de la soude ou de l'acide sulfurique. De plus, nous avons vu que la quantité d'acides volatils libérés par les protéides sériques est maximum quand ces protéides sont traités par l'acide paratoluènesulfonique à 25 p. 100 pendant quatre heures à 100°.

C. — Technique proposée pour le dosage de l'acide acétique lié aux protéides sériques.

Nous nous proposons de décrire dans ce chapitre la technique que nous avons mise au point et qui a été utilisée au cours de ce travail.

Le sérum et les différentes fractions qui ont été obtenues à partir du sérum sont préalablement soumis à la dialyse. De cette façon sont éliminés les sels qui se trouvent normalement dans le sérum ou qui ont été utilisés pour son fractionnement. La présence de certains de ces sels conduirait, en effet, à des résultats erronés. A un volume de sérum dialysé ou d'une solution de l'une de ses fractions on ajoute un volume égal d'une solution à 30 p. 100 d'acide paratoluènesulfonique. L'hydrolyse se fait à volume constant et à 100°. L'hydrolysat est ensuite distillé et le résidu soumis à l'entraînement par la vapeur d'eau jusqu'à épuisement complet. La distillation et les entraînements se font dans le vide de façon à être à l'abri du gaz carbonique de l'air. Nous avons généralement dosé ce premier distillat. Cette liqueur est ensuite traitée par l'oxyde rouge de mercure en présence d'acide sulfurique et de sulfate de magnésie, puis distillée à nouveau. Le second distillat est titré au moyen de la solution N/20 de soude en présence de 1 goutte de solution alcoolique de phénolphthaléine.

Nous avons jugé utile de donner les détails relatifs à la préparation des réactifs utilisés et à la conduite des méthodes employées. Nous décrirons, de plus, l'appareil que nous avons construit pour l'entraînement des acides volatils.

RÉACTIFS UTILISÉS. — Acide paratoluènesulfonique : le produit livré par le commerce sous le nom d' « acide paratoluène-sulfonique pur pour analyse » est un produit plus ou moins

coloré en brun. De plus, soumise à la distillation sa solution libère des acides volatils en quantité non négligeable. Nous avons donc jugé nécessaire de purifier le produit. L'impureté brune est plus soluble dans l'eau que l'acide paratoluènesulfonique lui-même. En utilisant cette différence de solubilité nous avons pu obtenir après deux cristallisations successives des cristaux incolores d'acide paratoluènesulfonique. Les eaux-mères ont servi à purifier de nouvelles quantités du produit. L'acide paratoluènesulfonique, très hygroscopique, est conservé à l'abri de l'humidité. Un essai à blanc nous a montré que le produit ainsi purifié ne renferme plus d'acides volatils.

SOLUTION DE SOUDE N/20 : on obtient une solution de soude privée de carbonate en dissolvant la soude jusqu'à saturation dans de l'eau distillée. La solution est ensuite refroidie à la glacière. Dans ces conditions le carbonate de sodium, éventuellement présent, précipite. On filtre sur filtre d'Iéna. On dilue rapidement le filtrat avec de l'eau distillée bouillie. On ramène ensuite la solution au titre convenable (39). La solution de soude N/20 est gardée à l'abri du gaz carbonique de l'air. Nous avons également utilisé dans nos dosages des solutions de soude, environ N/20, décarbonatées par addition d'une très faible quantité de baryte. Ces dernières solutions sont gardées sans aucune précaution particulière, elles sont titrées, avant chaque dosage, au moyen d'une solution étalon d'acide sulfurique N/20.

Oxyde rouge de mercure.

Sulfate de magnésie.

Solution d'acide sulfurique à 50 p. 100.

Un essai à blanc nous a prouvé que ces trois réactifs sont dépourvus d'acides entraînables par la vapeur d'eau.

DIALYSE. — On dialyse dans des sacs de collodion, sous pression, soit à la glacière contre de l'eau distillée, soit contre l'eau courante. Les solutions soumises à la dialyse sont additionnées de quelques gouttes de toluène.

(39) W. CLARK. *The Determination of Hydrogen Ions*, 1920, p. 71.

HYDROLYSE. — L'hydrolyse se fait au bain-marie bouillant, dans des ballons à rodage d'une capacité de 50 cent. cubes environ surmontés de réfrigérants ascendants. Quand l'hydrolyse est terminée, on refroidit le ballon puis on fait couler environ 10 cent. cubes d'eau distillée le long des parois intérieures du réfrigérant. Enfin on retire le ballon et l'hydrolysat est soumis à la distillation.

ENTRAINEMENTS DE L'ACIDE ACÉTIQUE. — *Description de l'appareil* : l'appareil que nous avons conçu est constitué d'un premier ballon (A) d'une capacité de 800 cent. cubes. Le col de celui-ci, d'une longueur de 25 centimètres est terminé par un rodage au-dessous duquel se trouve une tubulure latérale perpendiculaire à l'axe du ballon. Cette tubulure peut être mise en relation avec l'extrémité d'une burette de 50 cent. cubes (B) au moyen d'un caoutchouc à vide. Le ballon (A) plonge dans un bain-marie. Une pièce intermédiaire (C), courbée à angle droit et portant à ses deux extrémités un rodage, permet de réunir le ballon (A) au réfrigérant (D). Sur le côté de l'angle en relation avec le ballon (A) la pièce intermédiaire porte un renflement sphérique, limité à sa partie supérieure par une cloison au centre de laquelle se trouve un tube étroit et recourbé. Le passage de la vapeur d'eau du ballon (A) au réfrigérant (D) se fait à travers ce tube. L'extrémité du réfrigérant est terminée par un rodage s'adaptant au rodage du deuxième ballon (E) d'une capacité de 500 cent. cubes. Ce ballon porte une tubulure latérale qui est réunie à une trompe à eau, il plonge dans un cristallisoir rempli d'eau froide (voir fig. 1).

Marche de l'opération : on introduit dans le ballon (A) l'hydrolysat puis un tube capillaire fermé à sa partie supérieure qui agit comme catalyseur de l'ébullition. On réunit le ballon (A) au réfrigérant au moyen de la pièce intermédiaire, puis la burette à la tubulure latérale du ballon (A), enfin le ballon (E) à la trompe à eau. Le bain-marie est porté à la température d'environ 70°. Quand la distillation est commencée on interrompt la communication de l'appareil avec la trompe à eau. On poursuit la distillation jusqu'à ce que le résidu prenne un aspect sirupeux. On ouvre alors le robinet de

la burette et on laisse couler le long des parois du ballon (A) 10 cent. cubes d'eau. On pratique dix entraînements successifs, puis on titre le distillat.

L'appareil que nous venons de décrire a l'avantage considérable, du point de vue pratique, de permettre à l'entraînement par la vapeur d'eau de se poursuivre d'une façon continue jusqu'à l'épuisement complet du résidu. De la sorte

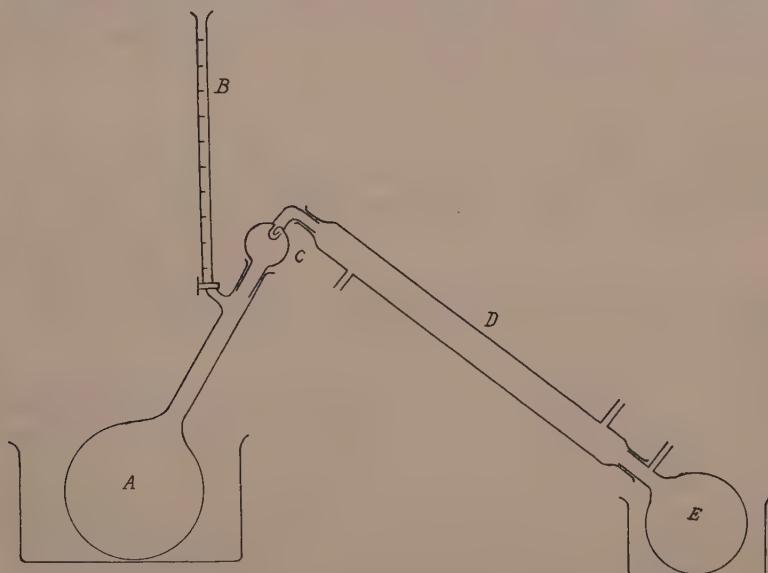


FIG. 1. — Appareil pour l'entraînement des acides par la vapeur d'eau et dans le vide.

nous avons réalisé un gain de temps notable, la durée de la distillation a été ainsi réduite à trente minutes environ.

De plus, la longueur du col du ballon (A) ainsi que la particularité du dispositif adopté dans la pièce intermédiaire (C) rendent pratiquement impossible la projection de particules de l'hydrolysat acide jusque dans le réfrigérant.

Signalons enfin que la réalisation de notre dispositif ne fait appel qu'à une verrerie courante dans un laboratoire de chimie.

TRAITEMENT PAR L'oxyde rouge de mercure. — Les liqueurs provenant de la distillation, que nous venons de décrire,

sont transvasées dans un ballon à rodage de 250 cent. cubes de capacité dans lequel on verse ensuite 0 gr. 50 d'oxyde rouge de mercure, 20 grammes de sulfate de magnésie et 2 cent. cubes d'acide sulfurique à 50 p. 100. On réunit le ballon à un réfrigérant ascendant. On porte le liquide à l'ébullition pendant quinze minutes. Après refroidissement, le distillat ainsi traité est distillé dans le vide. On pratique sur le résidu cinq entraînements successifs après addition de 10 cent. cubes d'eau chaque fois. Dans le distillat final on dose à nouveau les acides volatils.

D. — Caractérisation de l'acide volatil lié aux protéides sériques.

1° ETABLISSEMENT DE LA COURBE D'ENTRAÎNEMENT FRACTIONNÉ PAR LA VAPEUR D'EAU [MÉTHODE DE DUCLAUX] (40).

Un volume de 80 cent. cubes de sérum de cheval est traité suivant la technique indiquée pour le dosage des acides volatils. Le distillat final est concentré à un faible volume après alcalinisation puis distillé en présence d'un excès d'acide sulfurique. Ce dernier distillat, renfermant la totalité des acides volatils libérés par le sérum, est utilisé pour l'établissement de la courbe d'entraînement fractionné par la vapeur d'eau selon la méthode de Duclaux.

Principe de la méthode. — Un volume connu d'une solution diluée d'un acide volatil est placé dans un ballon réuni à un réfrigérant puis est soumis à la distillation. On recueille successivement des volumes égaux de distillat que l'on titre avec une solution alcaline quelconque. Les proportions d'acides volatils contenus dans les portions successives du distillat sont caractéristiques de l'acide volatil employé.

Technique. — L'appareil utilisé est constitué d'un ballon à rodage d'un volume de 300 cent. cubes et d'un réfrigérant à col recourbé. Le col du réfrigérant est terminé par un rodage s'adaptant à celui du ballon.

(40) G. BERTRAND et P. THOMAS. *Guide pour les manipulations de chimie biologique*, p. 412.

TABLEAU II.

VOLUME du distillat recueilli en centimètres cubes	ACIDITÉ du distillat exprimée en centimètres cubes N/20	ACIDITÉ exprimée en centièmes de l'acidité totale			
		Solution à analyser	Acide acétique	Acide formique	Acide propionique
10	0,78	5,6	5,9	3,5	44,5
20	1,62	11,6	12,2	7,2	22,8
30	2,56	18,4	18,6	11,3	33,5
40	3,50	25,2	25,6	15,5	44,0
50	4,50	32,4	32,7	20,2	54,0
60	5,60	40,4	40,4	25,5	63,3
70	6,74	48,6	48,7	31,1	72,5
80	8,00	57,7	57,5	38,5	84,0
90	9,48	68,6	67,5	48,0	88,5
100	11,24	81,0	80,0	59,0	95,0

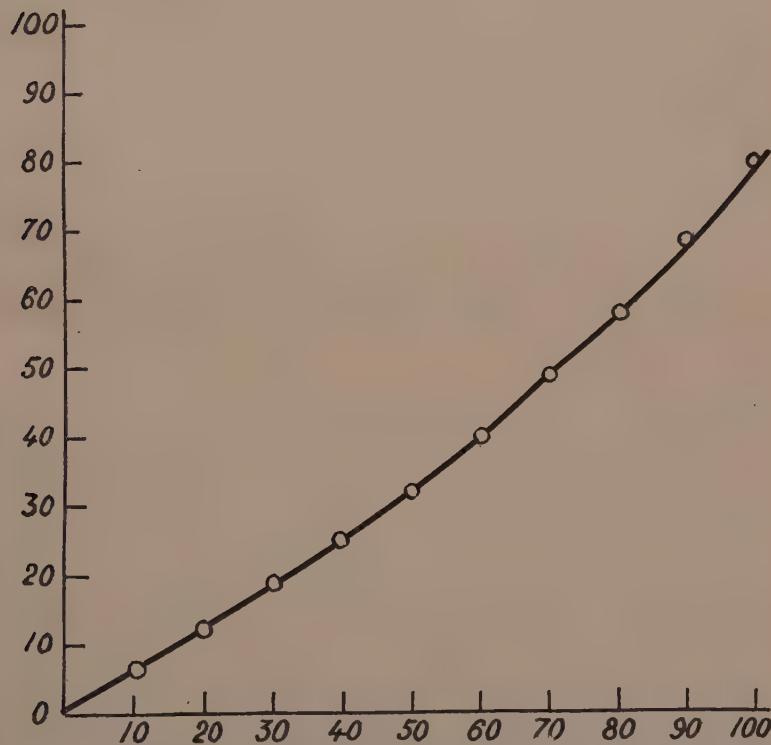


FIG. 2. — Entrainement fractionné par la vapeur d'eau d'une solution d'acide acétique (courbe d'après Duclaux) et d'une solution provenant des distillats sériques (0).

Nous avons introduit dans le ballon 110 cent. cubes de la solution préalablement titrée (ce volume correspond à 13 c. c. 86 de NaOH N/20) et nous avons conduit la distillation assez rapidement. Le distillat est recueilli dans des tubes jaugés, de 10 cent. cubes chacun, placés dans un portoir qui peut glisser rapidement sous le bec du réfrigérant. On peut ainsi, au cours de la distillation, substituer un tube au suivant sans qu'il y ait perte de liquide. Nous avons utilisé dans nos titrages la solution de NaOH N/20 et, comme réactif, la solution de phénolphthaleine. Les tubes sont rincés avec de l'eau distillée préalablement bouillie et les eaux de rinçage réunies au distillat.

Nous reproduisons dans la deuxième colonne du tableau II les lectures successives faites sur la burette. Les chiffres de la troisième colonne expriment en centièmes les proportions d'acide existant dans les 10, 20, 30, 40, etc..., premiers centimètres cubes du distillat, dans l'hypothèse que l'acidité des 110 cent. cubes de solution introduite dans le ballon correspond à 100 cent. cubes de solution de NaOH N/20. Nous avons fait cette transformation de façon à pouvoir comparer les résultats relatifs à la solution à analyser avec ceux relatifs à l'acide acétique, à l'acide formique et à l'acide propionique obtenus par Duclaux. La figure 2 reproduit la courbe de Duclaux en même temps que les résultats de notre analyse.

2^o DÉTERMINATION DU COEFFICIENT DE PARTAGE ENTRE L'ÉTHER ET L'EAU.

Les distillats neutralisés provenant de l'établissement de la courbe de Duclaux sont réunis, concentrés à un faible volume puis distillés après acidification par l'acide sulfurique. On détermine le titre du distillat ainsi obtenu. On verse ensuite dans une ampoule à décanter 20 cent. cubes du distillat et 22 cent. cubes d'éther, on agite à trois reprises, on laisse reposer, on décante soigneusement la phase aqueuse que l'on titre. Les mêmes mesures sont faites sur une solution d'acide acétique de concentration voisine de celle de la solution à étudier. Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau III.

TABLEAU III.

	SOLUTION à analyser	SOLUTION d'acide acétique
Phase aqueuse	3 c.c. 42 N/20	2 c.c. 78 N/20
Phase étherée	1 c.c. 42 N/20	1 c.c. 18 N/20
Coefficient de partage	0,44	0,42

3° DÉTERMINATION DU POIDS DES CENDRES.

Les solutions provenant de la détermination du coefficient de partage sont réunies, concentrées à un faible volume après alcalinisation par la soude, puis distillées en présence d'un excès d'acide sulfurique. Le distillat est traité ensuite par un excès de carbonate d'argent fraîchement préparé. On filtre. On concentre le filtrat à un faible volume. La solution ainsi obtenue est placée dans un tube de centrifugeuse et est additionnée d'alcool absolu jusqu'à ce qu'une nouvelle addition d'alcool ne précipite plus le liquide surnageant. Le culot de centrifugation est desséché dans le vide jusqu'à poids constant. Une partie du culot est pesée dans une capsule de platine puis est soumise à la calcination. Les résultats obtenus sont les suivants :

Poids de la substance avant calcination.	0,065
Poids du résidu après calcination.	0,0425
Teneur en argent du sel d'argent à analyser	65,3 p. 100
Teneur en argent de l'acétate d'argent.	64,6 p. 100

CONCLUSION. — Les mesures ont été faites sur une solution renfermant la totalité des acides volatils liés aux protéides sériques. Les résultats obtenus démontrent qu'il n'y a qu'un seul acide ainsi fixé et que cet acide est l'acide acétique.

E. — Teneur de quelques sérums en acide acétique.

Nous avons appliqué notre technique de dosage de l'acide acétique à l'étude de quelques sérums. Les résultats de nos expériences sont reproduits dans le tableau IV.

Les résultats obtenus montrent que la teneur des protéides sériques en acide acétique varie d'une espèce animale à une autre.

TABLEAU IV.

SÉRUM DIALYSÉ SOUMIS A L'HYDROLYSE	EXTRAIT SEC A 110° exprimé en grammes	ACIDE ACÉTIQUE exprimé en centimètres cubes N/20	TENEUR EN ACIDE ACÉTIQUE		
			de 1 gramme de protéide exprimée	en centimètres cubes N/20	en milligrammes
20 cent. cubes sérum humain normal.	1,636	4,96	3,03	9,09	0,780
20 cent. cubes plasma de mouton n° 1	1,3320	2,29	1,72	5,16	0,343
20 cent. cubes plasma de mouton n° 2 (2)	1,1430	1,98	1,72	5,16	0,348
20 cent. cubes sérum de cheval normal.	1,5600	4,66	2,98	8,94	0,720 (2)
20 cent. cubes sérum antidiptérique à 3.000 unités.	1,7760	4,48	2,54	7,62	0,672
20 cent. cubes sérum antidiptérique à 7.000 unités.	1,9100	5,27	2,75	8,25	0,750

(1) Cette détermination a été faite en tenant compte de la variation de volume due à la dialyse.
 (2) Les deux échantillons de plasma proviennent de deux saignées faites à une semaine d'intervalle, chez le même animal.
 (3) Nous tenons à rappeler ici que dans notre premier travail (voir page 265) nous avions trouvé que 1 litre de sérum de cheval libérait 5 cent. cubes d'acide acétique N, soit 0 gr. 30 d'acide acétique. Nous avons fait critique de ce travail dans les chapitres précédents.

F. — Conclusions.

L'examen des différentes techniques d'hydrolyse adoptées pour le dosage de l'acide acétique et des autres acides volatils fixés sur les protéides et sur les polyosides nous a montré que l'emploi des alcalis, comme agents d'hydrolyse, devait être rejeté. Ils détruisent, en effet, les oses dont la présence semble constante dans les protéides, pour former de l'acide lactique et d'autres acides qui souillent les distillats. De plus, tandis que l'acide lactique est détruit après traitement des distillats par l'oxyde rouge de mercure, les acides accompagnant l'acide lactique et provenant comme lui des réactions secondaires résistent à ce traitement. Pour des raisons semblables, l'acide sulfurique, utilisé par quelques auteurs, ne peut être adopté lui non plus dans l'hydrolyse des protéides.

Par contre, l'acide paratoluènesulfonique s'est révélé comme un agent d'hydrolyse satisfaisant puisqu'il ne forme pas, à partir des éléments des protéides, des acides entraînables par la vapeur d'eau. Cependant l'acidité des distillats provenant des hydrolysats des protéides sériques par l'acide paratoluènesulfonique baisse d'environ 10 p. 100 après traitement par la méthode de Friedermann. Ceci résulte de l'élimination du CO_2 , SO_2 et SH_2 du fait soit de l'ébullition, soit de l'oxydation mercurique. A partir de ces observations, nous avons mis au point une technique de dosage que nous avons décrite d'une façon détaillée.

L'acide volatil fixé sur les protéides sériques a été caractérisé comme étant l'acide acétique. En effet, la courbe d'entraînement fractionné par la vapeur d'eau, le coefficient de partage entre l'éther et l'eau ainsi que la teneur en argent du sel d'argent sont, avec une approximation de 1 p. 100 à 3 p. 100, ceux de l'acide acétique.

Enfin nous avons montré que la teneur en acide acétique des protéides sériques varie selon l'espèce animale à laquelle on s'adresse. Nous avons constaté, de plus, que l'immunisation fait baisser le taux de l'acide acétique des protéides sériques, tout au moins dans le cas observé qui est celui du cheval immunisé contre la diphtérie.

Le Gérant : G. MASSON.

